

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 C07K 13/00, 7/10, A61K 37/02 C12N 15/12, C12P 21/02 // (C12P 21/02, C12R 1/19) (C12P 21/02, C12R 1/91) C07K 99/00		A1	(11) 国際公開番号  WO 92/00325
		(43) 国際公開日 1992年1月9日 (09. 01. 1992)	
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 POT/JP91/00873 1991年6月27日 (27. 06. 91)		(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), NO, SE (欧州特許), US.	
(30) 優先権データ 特願平2/168766 1990年6月27日 (27. 06. 90) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 新居 淳 (NII, Atsushi) [JP/JP] 森下英昭 (MORISHITA, Hideaki) [JP/JP] 植村昭夫 (UEMURA, Akio) [JP/JP] 持田 英 (MOCHIDA, Ei) [JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 粂 経夫, 外 (HANABUSA, Tuneso et al.) 〒101 東京都千代田区神田駿河台1丁目6番地 お茶の水スクエアB館 粂特許事務所内 Tokyo, (JP)			
(54) Title: ANTICOAGULANT POLYPEPTIDES			
(54) 発明の名称 抗血液凝固活性を有するポリペプチド			
(57) Abstract			
Recombinant human urinary thrombomodulin and variant polypeptides produced as a result of replacement, deficiency, addition and like operations of amino acids in part of the amino acid sequence of the thrombomodulin, having a capability of binding with thrombin and anticoagulant and thrombolytic activities. They can be produced efficiently in large amounts by the gene recombination techniques, and are useful for preventing and treating diseases which participate in an increase of blood coagulation, because they are free from adverse effects such as induction of hemorrhage.			

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

組換えヒト尿トロンボモジュリンおよびそのアミノ酸配列の一部にアミノ酸の置換、欠損、付加等が施された変異型ポリペプチドは、トロンビン結合能、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を有する。本ポリペプチドは、遺伝子組換えの手法により大量に効率よく製造することができる。本ポリペプチドは、出血傾向等の副作用を示さないで、血液凝固亢進に係わる疾患の予防および治療に有効に用いることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャド
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

## 明 細 書

## 発 明 の 名 称

抗血液凝固活性を有するポリペプチド

## 技 術 分 野

本発明は遺伝子組換えによって得られる、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を有するヒトトロンボモジュリン様の活性を有する新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードするデオキシリボ核酸（以下DNAと記載する）、ならびに組換えDNA技術による当該ポリペプチドの製造方法に関する。本発明はまた、当該ポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤に関する。

## 背景技術

現在、抗血液凝固剤としてはヘパリンやアンチトロンビンⅢが使用されている。また、血栓溶解剤としては、尿または培養腎細胞から分離されたウロキナーゼや、 $\beta$ 溶連菌より抽出されたストレプトキナーゼなどが実用に供されており、さらに最近では、組織プラスミノゲンアクチベーターも使用され始めている。

しかし、これらの物質は、出血傾向等の副作用を有し、作用が抗血液凝固あるいは血栓溶解のいずれかに偏っている。

基礎研究の分野で、近年、N. L. Esmon らにより、線

溶を促進する活性化プロテインC生成促進作用と血液凝固阻害作用とを有する物質が家兎肺組織抽出物に存在することが報告され、トロンボモジュリンと命名された (J. Biol. Chem., 257, 859 (1982))。トロンボモジュリンは血管-内皮細胞上に存在するトロンビンレセプターであり、トロンボモジュリンと結合したトロンビンは血液凝固作用を失い、トロンビン-トロンボモジュリン複合体はプロテインCを活性化することにより抗凝固作用を示すことが丸山らにより報告されている (J. Clin. Invest., 75, 987, (1985))。すなわち、トロンボモジュリンは血液凝固阻害作用と線溶促進作用の両方の作用を発揮する可能性が有り、臨床応用が期待されている。

現在までに、ヒトのトロンボモジュリンについては、以下のような取得例が報告されている。なお、分子量については、断りのない限りドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、非還元状態での測定値を示した。

P. W. Majerus らは、ヒト胎盤よりトロンボモジュリンを精製し、分子量 75 K と報告し (J. Biol. Chem., 259, 12246, (1984))、青木らは、ヒト胎盤からトロンボモジュリンを精製し、分子量 71 K と報告した (Thrombosis Res., 37, 353, (1985) および特開昭 60-199819 号)。丸山らは、ヒト肺よりトロンボモジュリンを精製し、その性質は胎盤のものと同一であると報告した (J. Clin. Invest., 75, 987, (1985))。さらに、鈴

木らは、ヒト血小板よりトロンボモジュリンを部分精製し、分子量を78 Kと決めた上で、電気泳動上の挙動、トロンビンとの親和性およびプロテインCとの基質親和性より、血小板、胎盤および肺血管内皮細胞のトロンボモジュリンは互いに等しい性質を持つことを報告した(J. Biochem., 104, 628, (1988))。

また、前記のヒトのトロンボモジュリン(以下、ヒトトロンボモジュリンと総称する)と類似の性質を有する物質(以下、ヒトトロンボモジュリン様物質と総称する)については、以下のような存在例が報告されている。

P. W. Majerus らはヒト血漿から部分精製し、分子量63 Kと54 Kのものが存在することを示した。また、尿中にも類似の物質が存在することを示した(J. Clin. Invest., 75, 2178, (1985))。さらに、石井らは尿中には、分子量105 K, 63 K, 60 K, 33 K, 31 Kおよび28 K(何れも還元・非還元の違いが不明)のものが排泄されることを報告した(第108回薬学会抄録, 6F05, 11-1, (1988))。その他、尿中からの取得例として、分子量200 K, 48 Kおよび40 Kの混合物(特開昭63-30423号)、および、39 Kおよび31 K(特開昭63-146898号)のものが報告されている。

C. T. Esmon らはトロンボモジュリン分子の一部分に相当する化学合成ペプチドを製造している(特開平2-19399号)。

一方、遺伝子工学の手法により、鈴木らはヒト肺 c D N A ライブラリーから、シグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、全遺伝子構造を解明し、アミノ酸 18 個のシグナルペプチドに続く 557 残基のアミノ酸配列を明らかにし、ヒトトロンボモジュリンの N 末端アミノ酸配列は Ala Pro Ala Glu Pro であるとしている (EMBO Journal, 6, 1891, (1987))。さらに、鈴木らは、遺伝子工学で作製したヒトトロンボモジュリンは、天然の組織より精製したヒトトロンボモジュリンと同じ活性を有すること (J. Biol. Chem., 264, 4872 (1989))、また、ヒトトロンボモジュリン様活性はアミノ末端から 345 - 462 番目のアミノ酸残基に限局されており、その部分が一部でも欠けると活性を失うことを示した (J. Biol. Chem., 264, 10351, (1989) および第 12 回国際血栓止血学会抄録 334 頁、演題番号 1039, (1989))。また、R. W. Jackman らもヒトトロンボモジュリン前駆体の全遺伝子構造を解明し、アミノ酸 16 個のシグナルペプチドに続く 559 残基のアミノ酸配列を明らかにし、ヒトトロンボモジュリンの N 末端アミノ酸配列は Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro であるとしている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6425, (1987))。また、D. Wen らもヒト臍帯静脈 c D N A ライブラリーから、トロンボモジュリン前駆体の全遺伝子構造を解明し、アミノ酸 21 個のシグナルペプチドに続く 554 残基のアミノ酸配列を明らかにし、ヒトトロン

ボモジュリンのN末端アミノ酸配列はGlu Proであるとしている (Biochemistry, 26, 4350, (1987))。

また Andersen らも遺伝子工学の手法により、ヒトトロロンボモジュリン分子の一部分に相当するヒトトロロンボモジュリン様物質の産生を試みている (国際特許公開 W O 88/09811)。

さらに P. W. Majerus らも、同じく遺伝子工学の手段によりヒトトロロンボモジュリンの c D N A クローンを開発し、ヒトトロロンボモジュリンの全アミノ酸配列をもつタンパク質を発現させている (特開昭 6 3 - 3 0 1 7 9 1 号)。

#### 発明の開示

本発明者らは、ヒト c D N A ライブラリーよりヒトトロロンボモジュリン前駆体遺伝子を取り出し、その一部構造を種々の D N A フラグメントとして作製し、それを微生物や細胞に組み込んで、対応するポリペプチドの生物活性を研究していた。また、本発明者ら自身の別の研究により、ヒト尿より分子量 7 2 K のトロロンボモジュリン様の物質を得、(欧州特許公開 E P 3 7 6 2 5 1) その構造及び活性が、既に報告されているヒトトロロンボモジュリンと異なることを明らかにした。以下この物質をヒト尿トロロンボモジュリンと呼ぶ。このヒト尿トロロンボモジュリンと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびそのアミノ酸配列の一部にアミノ酸の置換、欠

- 6 -

損、付加等が施された変異型ポリペプチドをコードする DNA を作製し、それを組み込んだ微生物や細胞にて遺伝子を発現させ、得られたポリペプチドの生物活性を測定することにより、新たなトロンビン結合能、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を有するポリペプチドを取得することに成功し、本発明を完成した。以下これらのポリペプチドを組換えヒト尿トロンボモジュリン (r u T M と略す) と呼ぶ。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は抗血液凝固作用および血栓溶解作用などのヒトトロンボモジュリンと同様の作用を有する、遺伝子組換えによって得られる新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードする DNA、ならびに組換え DNA 技術による当該ポリペプチドの製造方法および当該ポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤に関するものである。本発明においては、下記に示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、トロンビン結合能、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を有するポリペプチドが提供される。なお、本発明においてはアミノ酸配列を N 末端から 3 文字表記で記載した。アミノ酸番号は鈴木らのヒトトロンボモジュリン (EMBO Journal, 6, 1891, (1987)) のものを基本に用いた。

X<sub>1</sub> Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu



- 7 -

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr  
15 20 25  
Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg  
30 35  
Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser Ser Val Ala Ala  
40 45 50  
Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly  
55 60  
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu  
65 70  
Pro Pro Gly Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro  
75 80 85  
Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn  
90 95  
Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn  
100 105 110  
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val  
115 120  
Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile  
125 130  
Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys Ala Asp Gly  
135 140 145  
Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg  
150 155

- 8 -

Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
160 165 170  
Val Ser Ile Thr Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg  
175 180  
Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser  
185 190  
Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys  
195 200 205  
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala  
210 215  
Arg Glu Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu  
220 225 230  
Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro  
235 240  
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala  
245 250  
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala  
255 260 265  
Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys  
270 275  
Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys  
280 285 290  
Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln  
295 300

- 9 -

His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu  
305 310  
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln  
315 320 325  
Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp  
330 335  
Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro  
340 345 350  
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro  
355 360  
Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu  
365 370  
Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys  
375 380 385  
Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp  
390 395  
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro  
400 405 410  
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr  
415 420  
Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser  
425 430  
Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys  
435 440 445

Y<sub>1</sub>

- 10 -

[式中  $X_1$  は下記式:]

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu

-15

-10

Ala Gly Leu Gly Phe Pro Ala Pro Ala

-5

-1 1

で表される配列、またはその N 末端から任意数もしくはすべてのアミノ酸が欠失した配列を示し、 $Y_1$  は下記式:

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Z Arg His

450

455

[但し、Z は Val または Ala]

で表される配列またはその C 末端から任意数もしくはすべてのアミノ酸が欠失した配列を示す]

好ましくは、 $X_1$  は下記式:

Ala Pro Ala

1

で表される配列、 $Y_1$  は下記式:

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Z Arg

450

455

[但し、Z は Val または Ala]

で表される配列またはその C 末端から任意数もしくはすべてのアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を示すポリペプチド。

更に好ましくは、 $X_1$  は下記式:

- 11 -

Ala Pro Ala

1

で表される配列、Y<sub>1</sub>は下記式：

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Z Arg

450

455

[但し、ZはValまたはAla]

で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または  
X<sub>1</sub>は下記式：

Ala Pro Ala

1

で表される配列、Y<sub>1</sub>のすべてのアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するポリペプチド。

更に、本発明のポリペプチドは、上記配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が糖鎖を有していても良いし、有していなくても良い。ここでいう糖鎖とは、単糖もしくはそれ以上の直鎖もしくは分枝鎖の糖鎖を意味し、いわゆるN-グリコシド結合型あるいはO-グリコシド結合型のいずれであっても良い。結合型糖鎖の違いによってトロンボモジュリンの活性が変化することが知られており、O-グリコシド結合型糖鎖に関して、最近Parkinson, J. F.ら(J. Biol. Chem. 265, 12602, (1990))はコンドロイチン硫酸様糖鎖が遺伝子工学的手法で作成したヒトトロンボモジュリンに結合していることを報告している。このような糖鎖を有するポリペプチドも本発明のポリペプチドに含有される。

ところで、近年の技術水準を持っていれば、ポリペプチドの活性に影響を与えず、その化学構造の一部を変化させることはきわめて容易である。従って、上記アミノ酸配列の一部にアミノ酸の置換、欠損、付加等を施したアミノ酸配列を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドに含まれる。

本発明によると、上記の本発明のポリペプチドをコードするDNAが提供される。本発明のDNAには、本発明のポリペプチドに、前述の置換、欠損、付加等が施されたポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAも含まれる。

本発明のDNAは本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を有するものであればいずれでもよいが、好ましくは、下記に示される塩基配列を有することを特徴とする。なお、本発明においてはDNAの塩基配列は5'末端側から記載した。また本発明においてA、G、CおよびTはデオキシアデニル酸、デオキシグアニル酸、デオキシシチジル酸およびチミジル酸をそれぞれ表わす。

```
X2  GAGCCGC AGCCGGGTGG CAGCCAGTGC GTCGAGCACG 100
    ACTGCTTCGC GCTCTACCCG GGCCCCGCCA CCTTCCTCAA 140
    TGCCAGTCAG ATCTGCGACG GACTGCGGGG CCACCTAATG 180
    ACAGTGCGCT CCTCGGTGGC TGCCGATGTC ATTTCTTTCG 220
    TACTGAACGG CGACGGCGGC GTTGGCCGCC GGCGCCTCTG 260
    GATCGGCCTG CAGCTGCCAC CCGGCTGCGG CGACCCCAAG 300
    CGCCTCGGGC CCCTGCGCGG CTTCCAGTGG GTTACGGGAG 340
```

- 13 -

ACAACAACAC CAGCTATAGC AGGTGGGCAC GGCTCGACCT 380  
CAATGGGGCT CCCCTCTGCG GCCCGTTGTG CGTCGCTGTC 420  
TCCGCTGCTG AGGCCACTGT GCCCAGCGAG CCGATCTGGG 460  
AGGAGCAGCA GTGCGAAGTG AAGGCCGATG GCTTCCTCTG 500  
CGAGTTCCAC TTCCCAGCCA CCTGCAGGCC ACTGGCTGTG 540  
GAGCCCCGGCG CCGCGGCTGC CGCCGTCTCG ATCACCTACG 580  
GCACCCCGTT CGCGGCCCGC GGAGCGGACT TCCAGGCGCT 620  
GCCGGTGGGC AGCTCCGCCG CGGTGGCTCC CCTCGGCTTA 660  
CAGCTAATGT GCACCGCGCC GCCCGGAGCG GTCCAGGGGC 700  
ACTGGGCCAG GGAGGCGCCG GCGCTTGGG ACTGCAGCGT 740  
GGAGAACGGC GGCTGCGAGC ACGCGTGCAA TCGGATCCCT 780  
GGGGCTCCCC GCTGCCAGTG CCCAGCCGGC GCCGCCCTGC 820  
AGGCAGACGG GCGCTCCTGC ACCGCATCCG CGACGCAGTC 860  
CTGCAACGAC CTCTGCGAGC ACTTCTGCGT TCCCAACCCC 900  
GACCAGCCGG GCTCCTACTC GTGCATGTGC GAGACCGGCT 940  
ACCGGCTGGC GGCCGACCAA CACCGGTGCG AGGACGTGGA 980  
TGA CTGCATA CTGGAGCCCA GTCCGTGTCC GCAGCGCTGT 1020  
GTCAACACAC AGGGTGGCTT CGAGTGCCAC TGCTACCCTA 1060  
ACTACGACCT GGTGGACGGC GAGTGTGTSG AGCCCGTGGA 1100  
CCCGTGCTTC AGAGCCAACT GCGAGTACCA GTGCCAGCCC 1140  
CTGAACCAAA CTAGCTACCT CTGCGTCTGC GCCGAGGGCT 1180  
TCGCGCCCAT TCCCCACGAG CCGCACAGGT GCCAGATGTT 1220  
TTGCAACCAG ACTGCCTGTC CAGCCGACTG CGACCCCAAC 1260  
ACCCAGGCTA GCTGTGAGTG CCCTGAAGGC TACATCCTGG 1300  
ACGACGGTTT CATCTGCACG GACATCGACG AGTGCGAAAA 1340

- 14 -

CGGCGGCTTC TGCTCCGGGG TGTGCCACAA CCTCCCCGGT 1380

ACCTTCGAGT GC Y<sub>2</sub> 1392[但し、式中 S は G または C, X<sub>2</sub>は下記式:

ATGCTTGGGG TCCTGGTCCT TGGCGCGCTG GCCCTGGCCG 40

GCCTGGGGTT CCCCGCCC GCA 63[但し、W は T または A]

で表される配列、またはその 5' 末端から 3 塩基単位で任意数もしくはすべての塩基が欠失した配列を示し、Y<sub>2</sub> は下記式:

ATCTGCGGGC CCGACTCGGC CCTTGYCCGC CAC 1425[但し、Y は T または C]

で表される配列、またはその 3' 末端から 3 塩基単位で任意数もしくはすべての塩基が欠失した配列を示す]

本発明の DNA は、また、上記塩基配列に加えて、その 5' 末端に適当なプロモーターや SD 配列（もしくは任意のリボソーム結合部位）を有していても良く、更に必要に応じて翻訳開始コドン、および 3' 末端に終止コドンをコードする塩基配列を有していても良い。

更に好ましくは、X<sub>2</sub>は下記式:

GCWCCCGCA 63[但し、W は T または A]

で表される配列、Y<sub>2</sub>は下記式:

ATCTGCGGGC CCGACTCGGC CCTTGYCCGC 1422[但し、Y は T または C]

で表される塩基配列を有する DNA、または、X<sub>2</sub>は下記



式：

GCWCCCGCA

63

[但し、W は T または A]

で表される配列、Y<sub>2</sub>のすべての塩基配列が欠失して  
いるDNA。

周知のように、遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子からコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を換えることなく、その遺伝子配列の、少なくとも1つの塩基を他の塩基に置換することができる。したがって、本発明のDNAは、遺伝子コードの縮重に基づき、上記塩基配列の1個以上の塩基が置換された塩基配列を有していてもよく、特に、本発明のポリペプチドを遺伝子工学的に製造する際に、特定の宿主細胞で使用頻度の高いコドンとなるように、1個以上の塩基を置換した塩基配列を有していても良い。

本発明のDNAは、天然物を材料として調製するか、または化学的に合成することができる。以下にそれらの方法の例を示す。

天然物を材料とする場合には、トロンボモジュリンmRNAを有する細胞もしくは組織より作製したcDNAライブラリーか、市販のcDNAライブラリー、もしくは染色体遺伝子を材料として、本発明のDNAを含有するDNAを得、それを変換して、本発明のDNAを得ることができる。

cDNAライブラリーを作製するには、まず、公知の

方法（例えばMolecular Cloning, a laboratory manual, T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)）に準じて、ヒトトロポモジュリンに対するmRNAを有するヒト組織あるいはヒト細胞からmRNAを抽出する。次に、公知の方法に従い、得られたmRNAを鋳型として、一本鎖cDNAを作製し、その後、一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する（Molecular Cloning, a laboratory manual, 既出, Landの方法、Nucleic Acid Reserch, 9, 2251-2266, (1981)、Okayama-Bergの方法、Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, (1982)、およびGubler-Hoffmanの方法、Gene, 25, 263 (1983)参照）。得られた二本鎖cDNAをpBR322やpUC18に代表されるプラスミドベクターあるいはλgt10やλgt11等に代表されるファージベクターにクローン化後、大腸菌等を形質転換してDNAライブラリーを得ることができる。

染色体遺伝子を材料とする場合には、ヒト組織あるいはヒト細胞から染色体DNAを抽出し、これを適当な制限酵素あるいは物理的手段にて分断後、プラスミドあるいはファージへクローン化し、大腸菌等を形質転換してDNAライブラリーを得ることができる。

このようにして得られたDNAライブラリーより、本発明のDNAを含有するDNAを検出し分離する。すなわち、適当な標識プローブを用いたハイブリダイゼーション法（Wallace et al., Nucleic Acid Res., 9, 879,

(1981) ) 等公知方法にて、当該 DNA を含有するプラスミドまたはファージを検出し、このプラスミドまたはファージから当該 DNA を分離する。標識プローブには、本発明により開示された、本発明のポリペプチドが有するアミノ酸配列の全部もしくは一部をコードするように合成した、DNA 断片もしくは RNA 断片を放射能標識したものが便利である。なお放射能標識は、カイネーション法、ニックトランスレーション法あるいはランダムプライムラベリング法等の方法を使用して、当該 DNA 断片もしくは RNA 断片を  $^{32}\text{P}$  で標識するのが一般的である。

上記の方法で DNA ライブラリーより分離された DNA を、以下の方法で本発明の DNA へと変換することができる。たとえば、その好ましい例の 1 つとして、DNA ライブラリーより分離された DNA を、制限酵素を用いて所望の部位で消化し、DNA 断片を得る。一方、本発明のポリペプチドの N 末端あるいは C 末端領域がコードする塩基配列ならびに終止コドン、制限酵素部位、あるいは翻訳開始コドン等を後に述べる方法で化学合成し、適当な合成リンカーを付加して、先に得られた DNA 断片と結合させ、プラスミドあるいはファージに所望の DNA としてクローン化することができる。塩基配列を化学合成する際に、塩基配列に任意の修正を加えることも可能である。

また、他の好ましい例として、Polymerase Chain Rea

ction (以下 P C R と略す) 法があげられる。すなわち、本発明のポリペプチドの N 末端、C 末端領域および中間領域をコードする塩基配列のオリゴヌクレオチド、もしくは、必要に応じて、それらに終止コドン、制限酵素部位、あるいは翻訳開始コドン等を加えた塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを化学合成する。これらをプライマーとして、前述の方法によりライブラリーより分離された D N A に対して P C R 法を行い、本発明の D N A を増幅させて得ることができる。プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、塩基配列に、任意の修正を加えたものでも良い。また、これらプライマーを利用して、直接、前述の D N A ライブラリーに対して P C R 法を行ない、本発明の D N A を増殖させた後、分離して、適当なプラスミドやファージにクローン化しても良い。なお、P C R 法は文献や成書 (PCR Protocols, A Guide to methods and applications, Michael A. I. et al, Academic Press, (1990)) を参考にして行うことができる。

以上の方法の他にも、Kramer, W 等の方法 (Nucleic Acid Res., 12, 9441-9465, (1984)) および Methods in Enzymology, 154, 350-367, (1988)) に準じた Site-directed mutagenesis 法等、公知方法を適宜利用して得ることができる。

一方、化学的に合成するには、所望の D N A を設計し、必要であれば適度の断片に分割した後、それらに相当するオリゴマーを全自動 D N A 化学合成機 (例えば 3 8 1

A 型、アプライドバイオシステムズ社製)を用いて化学合成する。得られたDNAオリゴマーを、必要があればT4ポリヌクレオチドキナーゼにてDNA 5'末端をリン酸化後、アニーリングする。さらに、必要があればT4 DNA リガーゼにて結合した後適当なベクターにクローン化することが可能である。

本発明によれば、下記より選ばれる少なくとも1つの工程を行うことを特徴とする、本発明のポリペプチドの製造方法が提供される。

- a) 当該ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを得る工程、
- b) 発現用ベクターに当該DNAを組み入れて、当該DNAを含む複製可能な組換えDNAを得る工程、
- c) 当該組換えDNAで宿主細胞を形質転換させて、当該ポリペプチドを発現し得る形質転換体を得る工程、
- d) 該形質転換体を培養して、当該ポリペプチドを産生せしめ、培養混合物から当該ポリペプチドを回収する工程。

本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAは、前述の方法により得ることができる。

また、ここで使用する発現用ベクターとしては、使用する宿主内で複製可能なベクターであればいずれでもよいが、好ましくは、当該ポリペプチドを宿主内で発現させるために必要なプロモーター、更に必要に応じてSD配列(もしくは任意のリボソーム結合部位)および/あ

るいはシグナルペプチドをコードするDNAを含有し、使用する宿主内で複製可能なベクターを選択する。使用するプロモーター、SD配列（もしくは任意のリボゾーム結合部位）およびシグナルペプチドをコードするDNAは、使用する宿主内で機能するすべてのプロモーター、SD配列（もしくは任意のリボゾーム結合部位）およびシグナルペプチドをコードするDNAが使用可能であり、これらは化学的に合成するか、あるいは使用する宿主、ウイルス、プラスミド、ファージ等から入手することが可能である。

得られた組換えDNAを導入する宿主細胞は、COS細胞、CHO細胞、酵母等に代表される真核生物細胞であっても、また、大腸菌、枯草菌等に代表される原核生物細胞であっても良く、本発明のポリペプチドの発現に適した細胞を適宜選択して使用することができるが、好ましくは、COS細胞、CHO細胞がよい。また、宿主細胞と発現用ベクターは、互いに機能し合い、当該ポリペプチドをコードするDNAを発現し得る組み合わせで使用するのが有用である。例えば、発現用ベクターと宿主の組み合わせの好ましい例としては、COS-7細胞またはCHO細胞と、シミアンウイルス40（SV40）の初期のプロモーターを含有する発現用ベクター、 $\beta$ アクチンのプロモーターを含有するpHBAPr-neoまたはSR $\alpha$ プロモーターを含有するpCDL-SR $\alpha$ 296由来の哺乳動物発現ベクター、大腸菌HB101

株とトリプトファンプロモーター、トリプトファン S D 配列をコードする DNA を含有する発現用ベクターの組み合わせなどがあげられる。

発現用ベクターで形質転換された宿主は、微生物あるいは動物細胞を培養するのに用いられる一般的方法、例えば「生物化学工学」（合葉修一等著、1976年、東京大学出版会）、「組織培養」（中井準之助等編、1976年、朝倉書店）等に記載された方法に準じて培養することができる。形質転換された宿主によって生産される当該ポリペプチドは、培養混合物から単離、精製して回収することができる。精製は、多くの文献や成書、例えば、「生化学実験講座1タンパク質の化学」（日本生化学編、東京化学同人、1976年）等に記載された方法を参考にして実施することが可能であり、すなわち、精製方法として透析、塩析、ゲルろ過、酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速クロマトグラフィー、電気泳動等を適宜組み合わせで行なうことができる。好ましくは、本発明のポリペプチドを含む培養混合液を、イオン交換クロマトグラフィー、トロンピンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーのうちから選ばれる少なくとも1つを用いて製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを含む培養混合液を、分画分子量3万の限外濾過膜等を用いて脱塩濃縮する。

ついで、濃縮した培養混合液を  $pH\ 5 \sim 10$ 、好ましくは  $pH\ 7.3 \pm 0.2$  に調整した後に、蛋白分解酵素を不活性化するため、 $50 \sim 70^\circ C$  で  $5 \sim 45$  分間、好ましくは  $60 \pm 5^\circ C$  で  $15 \pm 5$  分間処理し、 $pH\ 5.5 \sim 7.5$ 、好ましくは  $pH\ 6.5 \pm 0.2$  にコンディショニングした陰イオン交換樹脂カラムに通して活性画分を吸着させる。ついで、 $pH\ 2 \sim 4.5$ 、好ましくは  $pH\ 4.0 \pm 0.05$  の緩衝液で活性画分を溶出する。溶出液は、分画分子量 3 万の限外濾過膜で脱塩濃縮した後、 $pH\ 7.5$  に調整し、トロンピンをリガンドとしたアフィニティカラムに通し、 $0.05 \sim 0.3\ M\ NaCl$ 、好ましくは  $0.1 \pm 0.05\ M\ NaCl$  を含む洗浄液で洗浄後  $0.9 \sim 2.0\ M\ NaCl$ 、好ましくは  $1.0 \pm 0.05\ M\ NaCl$  を含む溶出液で活性画分を溶出する。溶出液を脱塩濃縮した後、再度トロンピンをリガンドとしたアフィニティカラムに通し、 $0.3 \sim 0.8\ M\ NaCl$ 、好ましくは  $0.7 \pm 0.1\ M\ NaCl$  を含む洗浄液で洗浄後  $0.9 \sim 2.0\ M\ NaCl$ 、好ましくは  $1.0 \pm 0.05\ M\ NaCl$  を含む溶出液で活性画分を溶出する。溶出した活性画分を脱塩濃縮した後、ゲル濾過カラムにて本発明のポリペプチドに相当する活性画分を分画分取すれば、本発明のポリペプチドを純粋な形で得ることができる。また、アフィニティカラムにて溶出した画分を脱塩濃縮後、非還元状態の SDS-PAGE で分離し、本発明のポリペプチドを純粋



な形で得ることもできる。得られた本発明のポリペプチドは、 $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で10時間処理をすることによりウィルスを不活化し、医薬品として適した状態にすることができる。

上述した精製過程で用いる陰イオン交換樹脂としては、DEAEセルロース、DEAEセファロース、DEAEセルロファインなどがあり、トロンビンをリガンドとしたアフィニティカラムは、セルロース、アガロース、デキストランなどの担体に、臭化シアンを用いてトロンビンを結合させた後、ジイソプロピルフルオロフォスフェート（DIP）、フェニルメタンスルフォニルフロリドなどで処理したものを使用する。ゲル濾過用の樹脂としては、セファクリルS-200、セファクリルS-300、セファデックスG150などを用いることができる。

上記の方法により、本発明のポリペプチドを純粋な形で得ることができる。同様の方法により、類似した性質を持つ別物質を得ることもできる。

本発明のポリペプチドの作用および性質を以下に示す。

（実験例1）トロンビンに対する親和性（抗トロンビン作用）

a) DIP-トロンビンアガロースを用いるクロマトグラフィー処理で、実施例3でpKCR-TM-Va1由来の組換えヒト尿トロンボモジュリン（以下ruTM-Va1と略す）および実施例6-(2)で作製した組換えヒト尿トロンボモジュリン（以下ruTM-Ala

と略す) はほぼ 100% 吸着する。

b) 牛トロンビン (1 U / mL, 持田製薬社製) 100  $\mu$  L と r u T M - V a l または r u T M - A l a を含む溶液 100  $\mu$  L とを混和し、37 °C で 30 分間加温した後、ヒトフィブリノーゲン (2 mg / mL, SIGMA 製) 100  $\mu$  L を加え、コアギュロメーター (アメルング社製) にて凝固時間を測定する。

結果を第 1 表に示す。

第 1 表

薬 物	濃 度 (OD <sub>280</sub> )	凝固時間 (秒)
対 照	—	37.8
r u T M - V a l	0.01	> 500
r u T M - A l a	0.01	> 500

この結果に示されるように、r u T M - V a l および r u T M - A l a はトロンビンと結合し、その凝固活性を著しく抑制する作用を有する。

第 2 表に、特開昭 62 - 169728 号公報記載のヒト胎盤より精製したトロンボモジュリン様物質についての凝固時間の測定結果を引用して示す。

第 2 表

薬 物	濃 度 (OD <sub>280</sub> )	凝固時間(秒)
対 照	—	35.8
ヒト胎盤トロンボ モジュリン様物質	0.42	62.3
	0.84	109.9

さらに、同公報の記載によれば、このヒト胎盤トロンボモジュリン様物質は既存のヒトトロンボモジュリンより2倍以上強力であるとの記載があり、第1表と第2表の比較から、*ruTM-Va1* および *ruTM-A1a* は既存のヒトトロンボモジュリンより強力な抗トロンビン作用を有すると考えられる。

(実験例2) プロテインC活性化能

トロンビン共存下でのプロテインCの活性化能を合成基質 *Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA* (財団法人蛋白質研究奨励会ペプチド研究所製) を用いて測定する。すなわち、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 60  $\mu$ L に牛トロンビン (持田製薬製) 10 U/mL 溶液を 20  $\mu$ L 添加し、実施例6-(2) で作製した *ruTM-A1a* およびヒト尿トロンボモジュリンのC末端アミノ酸10個が欠失した変異型の組換えヒト尿トロンボモジュリン (以下 DEL10 と略す) を含む溶液 (0.1~10  $\mu$ g/mL) 10  $\mu$ L を添加し、さらに、ヒトプロテインC (アメリカンダイアグノ

ステイカ社製)の $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を $10\mu\text{L}$ 添加する。 $37^\circ\text{C}$ で30分間反応した後、反応液にヒトアンチトロンビン(ミドリ十字製) $1\text{U}/\text{mL}$ とヘパリン(持田製薬製) $10\text{U}/\text{mL}$ の等量混合液を $150\mu\text{L}$ 添加して混和後、さらに、 $37^\circ\text{C}$ で15分間反応する。ついで、反応液に前記合成基質 $0.1\text{mM}$ 溶液を $250\mu\text{L}$ 添加して、 $37^\circ\text{C}$ で10分反応後に、20%酢酸溶液 $500\mu\text{L}$ を添加して反応を停止する。その後、反応液を蛍光光度計(日立製作所製)を用いて、励起波長 $380\text{nm}$ 、発光波長 $460\text{nm}$ で蛍光強度を測定する。ポジティブコントロールとして、ヒト胎盤より参考例に示した方法で精製したヒト胎盤トロンボモジュリンを用いた。蛍光強度からプロテインC活性化能を算出すると、 $\text{ruTM-Ala}$ および $\text{DEL10}$ は第3表に示すごとく、トロンビン共存下でヒト胎盤トロンボモジュリンに比べて著しいプロテインC活性化能を有する。

第3表

	活性*1
$\text{ruTM-Ala}$	3.8
$\text{DEL10}$	4.1
ヒト胎盤トロンボモジュリン	1.0

\*1: ヒト胎盤トロンボモジュリンの活性を1とする

(実験例 3) 抗血液凝固活性

健常人クエン酸添加乏血小板血漿 100  $\mu$ L と、r u T M - V a l または r u T M - A l a を含む溶液 (10 ~ 100  $\mu$ g / mL) 10  $\mu$ L を混和し、37  $^{\circ}$ C で 2 分間加温した後、ヒトトロニン (ミドリ十字製、2 U / mL) 100  $\mu$ L を加え、凝固時間を測定すると、r u T M - V a l および r u T M - A l a は強力な血液凝固時間延長作用を示す。

(実験例 4) マウスにおける急性毒性

5 匹の d d Y 系雄性マウスを用いて、r u T M - V a l または r u T M - A l a を静脈内投与し、7 日後までの観察を行なうと、薬効用量において著明な毒性や死亡例は 1 例も認められなかった。

(実験例 5) 溶解性

r u T M - V a l および r u T M - A l a は、室温において少なくとも 30 mg / mL の濃度まで蒸留水に溶解した。

また、可溶性である r u T M は、i n v i v o において静脈内投与した場合、リン脂質との結合能を有する難溶性の胎盤トロニンボモジュリンにくらべてすぐれた D I C 改善作用を示す。

以上の説明及び実験から明らかなように、本発明のポリペプチドは強力なトロニン結合能、抗血液凝固作用および血栓溶解作用を有し、さらに毒性も低いことから、例えば、D I C、各種血栓症、末梢血管閉塞症、心筋梗

塞、脳梗塞、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、肝不全、腎不全など、血液凝固亢進に係わる疾患の予防および治療に有効であると予想される。

本発明のポリペプチドは、薬剤として一般的に用いられる適当な担体または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、安定化剤または保存剤等と適宜組合せて、患者に効果的に投与するのに適した医薬用製剤、好ましくは注射剤に調製することができる。本発明のポリペプチドを注射剤として用いる場合には、一日1回ないし6回に分割して、一度にあるいは持続的に患者に投与される。その一日投与量は、ウサギ肺トロンプモジュリンに換算した力価で表すと、本発明のポリペプチド0.05～500mg力価、好ましくは0.1～10mg力価であるが、患者の年齢、体重、症状等に応じて適宜増減することが出来る。

さらに、本発明のポリペプチドは人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用器材の表面に架橋剤などを用いて結合・吸着させて使用することができる。これにより、医用器材表面での血液凝固を防ぐことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例をもって、本発明を一層具体的に説明するが、これらは実施の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、

以下の記載において用いる略号は当該分野における慣用略号に基づくものである。

また、遺伝子組換えに関わる技法として、特に記載のない限り「Maniatis, T. et al. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)」、「遺伝子操作実験実用ハンドブック、小林茂保 監訳 ジャテック出版(1985)」等の書物ならびに試薬あるいは器具に添付のプロトコルを採用して行った。また、使用した制限酵素については特に記載のない限り、宝酒造社製または、ニューイングランドバイオラブ社製のものを用了。

なお、実施例に開示する r u T M - A 1 a 高発現株 T M M - B 1 C は通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年6月25日より微工研条寄第3463号 ( F E R M B P - 3 4 6 3 ) として寄託されている。

#### 実施例 1

トロンボモジュリン c D N A のクローニングと発現プラスミドの作製

( 1 ) トロンボモジュリン c D N A のクローニング

ヒト尿より精製単離されたヒト尿トロンボモジュリンの N 末端アミノ酸配列の一部である、

Glu His Asp Cys Phe Ala

15

を基に、第1図に示すオリゴヌクレオチドを化学合成機(既出)にて作製した。O P C カラム (アプライドバイ

オシステム社製) にて精製後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 及び  $[\gamma - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$  (アマシャム社製) を使用し、5' 末端標識した。次にこの反応液を Sephadex G-25 (ファルマシア社製) にアプライし、標識オリゴヌクレオチドを  $[\gamma - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$  より分離し、プローブとして以後の操作に使用した。

ヒト胎盤約 20 g を材料として、グアニジンチオシアネート法により全 RNA を抽出した。得られた RNA のうち 10 mg を使用して、オリゴ dT セルコース (タイプ 7、ファルマシア社製) カラムに 2 回通すことにより、ポリ A<sup>+</sup> RNA 約 90  $\mu\text{g}$  を精製した。次にこのポリ A<sup>+</sup> RNA を材料として cDNA のクローニングを行った。すなわち、ポリ A<sup>+</sup> RNA 20  $\mu\text{g}$  より、オリゴ dT をプライマーとして、Gubler と Hoffman の方法 (Gubler, U. and Hoffman, B. J. Gene, 25, 263 (1983)) に従って、2 本鎖 cDNA を作製した (cDNA 合成システム (アマシャム社製) を使用)。cDNA を EcoRI メチラーゼによりメチル化した後、EcoRI リンカーをライゲーションし、EcoRI にて切断後、リンカーおよび約 500 bp 以下の DNA をゲルろ過 (Bio Gel 1 A 50 m、バイオラッド社製) によって除去した。この DNA をファージベクター  $\lambda\text{gt}11$  (アマシャム社製) へクローニングし、挿入効率約 90%、独立クローン数約  $2 \times 10^6$  個の cDNA ライブラリーを作製した。この  $\lambda\text{gt}11$  ライブラリーのファージを常法に従い、



大腸菌 Y 1 0 9 0 株を宿主として、9 c m シャーレあたり約  $5 \times 10^3$  ケとなる様にブランクを生じさせた。このブランクを、ナイロン膜 (Hybond-N, アマシヤム社製) へ転写させ、膜を 1. 5 M N a C l / 0. 5 M N a O H 次いで 1. 5 M N a C l / 0. 5 M T r i s - H C l (p H 8. 0) の順序にて、各溶液を含ませたる紙上に 5 分間ずつ置くことにより、D N A を変性させた。次に同膜を 0. 3 6 M N a C l / 2 0 m M リン酸ナトリウム (p H 7. 4) / 2 m M E D T A (p H 7. 4) にて洗浄した後、風乾させた。紫外線照射により、膜上に D N A を固定させた後、さらに同膜を 0. 1 % S D S /  $\times 0. 1$  S S C 中にて (S S C :  $\times 1$  濃度 1 5 0 m M N a C l / 1 5 m M クエン酸ナトリウム (p H 7. 0) ) 6 5 °C, 1 時間洗浄した。この D N A を固定した膜を、 $\times 6$  S S C / 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 6. 8) /  $\times 1$  デンハルト溶液 / 1 0 0  $\mu$  g / m L 変性サケ精子 D N A 中で、6 5 °C, 6 ~ 2 4 時間ハイブリダイゼーションを行ない、さらに同溶液に先の 5 ' 末端標識オリゴヌクレオチドを約  $10^6$  c p m / m L 添加した溶液にて 3 7 °C で一晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、 $\times 6$  S S C にて 4 °C, 3 7 °C 及び 4 2 °C にて各々 5 ~ 3 0 分間膜を洗浄後、風乾させ、オートラジオグラフィーを行なった。

以上の操作を、ブランク約  $3 \times 10^6$  個に対して行ない、使用したプローブに陽性を示した 2 3 個のクローン

を分取した。分取したクローン化ファージにて再びブランクを形成後、前述のハイブリダイゼーション操作を行ない、再び陽性を示したクローン9個について、ファージDNAを採取した。制限酵素EcoRIで消化した結果、λgt11中には、約0.7～2.5kbの挿入DNAが認められた。この内最長を示した2.5kb DNAの制限酵素地図を第2図に示す。この地図上、EcoRI及びPstIを両端にもつ2種の断片を、常法に従いM13ファージmp18あるいはmp19へサブクロニングを行ない、一本鎖ファージを調製後、DNAシーケンサー（370A、アプライドバイオシステムズ社製）にて塩基配列を決定した。その結果、約0.4kbのEcoRI/PstI DNA断片の塩基配列から想定されるアミノ酸配列に、ヒトトロンプモジュリンのN末端配列に一致するものが認められ、本cDNAがヒト尿トロンプモジュリンのものである事が確認された。2.5kb DNAの他の領域に塩基配列を決定した結果を第3図（a）～第3図（m）に示す。

（2）組換えヒト尿トロンプモジュリン発現ベクターの作製

哺乳動物細胞発現用プラスミドの作製（第4図（a）～第4図（b））

2.5kbのトロンプモジュリンcDNAをEcoRI消化し、アガロースゲル電気泳動後、ゲルより単離し、プラスミドpUC118へサブクロニングした。プラ

スミドDNAを調製し、EcoRIにて消化後、T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）にて平滑末端とした。この末端にBamHIリンカー（宝酒造社製）をライゲーションキット（宝酒造社製）にて接続させた後、BamHIおよびKpnIにて二重消化し、得られた約1.5 kbのDNA断片を泳動後ゲルより単離した。

一方、第5図（a）に示されるトロンボモジュリンcDNA KpnIサイトからヒト尿トロンボモジュリンC末端アミノ酸配列（Leu Ala Arg）をコードし、直後に終止コドンおよび制限酵素BamHIサイトを含む2種のリンカーDNA（各々49 merおよび53 merの組み合わせ）を前述の合成機（既出）にて作製した。但し、オリゴヌクレオチドの精製は逆相HPLC（C8カラム、AQUAPORE RP-30、アプライドバイシステムズ社製）にて行った。49 merのオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼ（既出）にて5'末端をリン酸化後、53 merオリゴヌクレオチドとアニーリングさせた。

次に本リンカーを、用意した約1.5 kbトロンボモジュリンcDNAのBamHI/KpnI断片とライゲーションし（既出）、続いてBamHIにて消化後アガロース電気泳動を行いゲルより約1.6 kb DNAを単離した。また一方で哺乳動物細胞発現用ベクターpKCR（O'Hara, K, et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1527 (1981))をBamHIにて消化後、フォスファ

ターゼ（宝酒造社製）処理を行なった直鎖状DNAを用意し、これと1.6 kb DNAをライゲーション（既出）しヒト尿トロンボモジュリン動物細胞発現用プラスミド、pKCR-TM-A1aおよびpKCR-TM-Valを作製した。

大腸菌発現用プラスミドの作製（第6図（a）～第6図（b））

既出のプラスミドpKCR-TM-A1aおよびpKCR-TM-ValをBamHIおよびSmaIにて二重消化して各々の生じた1.3 kb DNA断片をアガロースゲル電気泳動後単離した。一方、第5図（b）に示す69 merおよび67 merからなるリンカーを前述の様にDNA合成機にて作製した。このうち67 merのオリゴヌクレオチドのみをヌクレオチドキナーゼにてリン酸化を行なった後、2種をアニーリングし、先の1.3 kb DNAとライゲーションし、ついでSmaIおよびBamHIにて二重消化した。また一方で、プラスミドpM450（Kanamori, T. et al, Gene, 66, 295～300, (1988)）をBamHIとNdeIにて二重消化し得られた約3.2 kb DNAをアガロースゲル電気泳動後単離した。この約3.2 kb DNAと、前述のトロンボモジュリンcDNAとリンカーDNAの接続されたDNA 2種とをライゲーションし、ヒト尿トロンボモジュリン大腸菌発現用プラスミドpM450-TM-A1aおよびpM450-TM-Valを作製した。

## 実施例 2

トロンボモジュリン cDNA のクローニングと発現プラスミドの作製

(1) トロンボモジュリン cDNA のクローニング

実施例 1 - (1) で得られたヒト胎盤由来のポリ A<sup>+</sup>RNA 10  $\mu$ g より、常法に従ってオリゴ dT をプライマーとして逆転写酵素（宝酒造社製）により 1 本鎖 cDNA を作製した。

一方、実施例 1 - (1) で得られたヒト尿トロンボモジュリンをコードする cDNA の塩基配列の一部に対応し、かつ 5' 端に制限酵素 S a l I, B a m H I, E c o R I, H i n d III または P s t I のいずれかの認識部位を有するオリゴヌクレオチド 6 種（第 7 図）を化学合成機（既出）にて作製した。但し、S 1, S 2, S 3, 及び、A 1, A 2, A 3 はそれぞれヒト尿トロンボモジュリン cDNA の + 鎖及び - 鎖の一部に対応する。尚、S 3 にはサイレントミューテーションにより制限酵素 X h o I 認識部位を導入した。また、A 3 は終止コドンに対応する DNA 配列を含む。合成したオリゴヌクレオチドは、O P C カラム（既出）にて精製した。

次に、1 本鎖 cDNA を鋳型とし化学合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして P C R を行い、ヒト尿トロンボモジュリン cDNA を 3 つの部分に分割して増幅した。即ち、1 本鎖 cDNA 約 50 ng、プライマー

(S 1 及び A 1) 各 0. 8  $\mu$ g、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (パーキンエルマーシートス社製) 2. 5 ユニットを含む 10 mM Tris-HCl (pH = 8. 3) / 50 mM KCl / 1. 5 mM MgCl<sub>2</sub> / 0. 01 % ゼラチンから成る反応液 100  $\mu$ L をサーマルサイクラー (パーキンエルマーシートス社製) にセットし、アニーリング: 55 °C, 2 分, 相補鎖合成: 72 °C, 3 分, 熱変性: 94 °C, 1 分, サイクル数: 30 の条件下で PCR を行い、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈澱による精製を経て増幅した約 450 bp の大きさを有する DNA: フラグメント I を得た。同様に、プライマーとして S 2 及び A 2 または S 3 及び A 3 を用いて PCR を行い、約 650 bp の大きさを有する DNA: フラグメント II, 約 350 bp の大きさを有する DNA: フラグメント III を得た。フラグメント I, II, III は各々 S a l I / B a m H I, H i n d III / S a l I, P s t I / B a m H I で制限酵素消化した後常法に従って pUC118 へサブクローニングし、pUC118-F I, pUC118-F II, pUC118-F III を各々作製した。

PCR により増幅して得たヒト尿トロンボモジュリン cDNA の 3 つの DNA 断片は以下の操作に従って連結し、シグナルペプチド及び成熟蛋白全長をコードし、かつ 3' 末端に終止コドンが付加された cDNA を得た。まず初めに、pUC118-F I を制限酵素 H i n d III

及び B a m H I で消化し、アガロースゲル電気泳動により常法に従って約 4 5 0 b p の大きさを有する D N A を分離した。この D N A を更に制限酵素 D d e I で消化し精製して、5' 末端が H i n d III 切断面、3' 末端が D d e I 切断面を有する D N A : F I を得た。同様に p U C 1 1 8 - F II から、制限酵素 H i n d III, S a l I 消化、分離、制限酵素 D d e I 消化、精製を経て、5' 末端が D d e I 切断面、3' 末端が S a l I 切断面を有する約 6 5 0 b p の大きさの D N A : F II を、また p U C 1 1 8 - F III から、制限酵素 X h o I、E c o R I 消化、分離精製を経て、5' 末端が X h o I 切断面、3' 末端が E c o R I 切断面を有する約 3 5 0 b p の大きさの D N A : F III を得た。次に、F I, F II, F III と p U C 1 1 8 の H i n d III / E c o R I 消化物とを常法に従ってライゲーションさせ、所望の c D N A を含むプラスミド p U C - T M を作製した。(構築過程を第 8 図に示す。)

また、c D N A 部分を常法に従い M 1 3 フォージ m p 1 8 あるいは m p 1 9 へサブクローニングし、1 本鎖 D N A を調製後 D N A シーケンサー(既出)にて塩基配列を決定した結果、本 c D N A がヒト尿トロンボモジュリンをコードする c D N A であることが確認された。

塩基配列を決定した結果を第 9 図(a) ~ 第 9 図(b) に示す。

(2) 組換えヒト尿トロンボモジュリン発現ベクターの

## 作製

実施例 2 - (1) で作製したヒト尿トロンボモジュリン cDNA を含むプラスミド pUC-TM を制限酵素 S a l I 及び B a m H I で消化し、アガロースゲル電気泳動により、常法に従って約 1.4 kb 長を有する DNA 断片を分離、精製した。これを、哺乳動物細胞発現ベクター p H  $\beta$  A P r - 1 - n e o (P. Gunning et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4831, (1987)) のクローニングサイト S a l I - B a m H I 間に挿入し、トロンボモジュリン発現ベクター L K 4 4 4 - T M を構築した。次に、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下 D H F R と略す) 遺伝子を含むプラスミド p A d D 2 6 S V (A) (R. J. Kaufman et al., Mol. Cell. Biol., 2, 1304, (1982)) を制限酵素 B g l I 消化し、T4 DNA ポリメラーゼ (既出) にて平滑末端とした後、制限酵素 E c o R I で消化し、アガロース電気泳動により常法に従って約 3 kb 長の D H F R 遺伝子を含む DNA 断片を分離、精製した。一方、L K 4 4 4 - T M を制限酵素 A a t II 消化し、T4 DNA ポリメラーゼ (既出) で平滑末端とした後、制限酵素 E c o R I で消化し、アガロース電気泳動により常法に従って約 9 kb 長の DNA を分離、精製した。これと、先に調製した D H F R 遺伝子を含む DNA 断片とを常法に従ってライゲーションさせ、L K 4 4 4 - T M - D H F R を構築した。(第 10 図 (a) ~ 第 10 図 (b))



次に、pUC-TMを制限酵素S<sub>al</sub>I及びE<sub>co</sub>R Iで消化し、アガロース電気泳動により常法に従って約1.4 kb長を有するDNAを分離、精製した。これを、哺乳動物細胞発現ベクターpCDL-SR $\alpha$ 296 (Y. Takebe et al., Mol. Cell. Biol., 8, 466, (1988))のクローニングサイトPst I-E<sub>co</sub>R I間に、化学合成機(既出)にて作製しOPCカラム(既出)にて精製したPst I-S<sub>al</sub>Iリンカー(5'-TCGATGCA-3')と共に挿入し、ヒト尿トロノボモジュリン発現ベクターpCDSR $\alpha$ -TMを構築した。次に、これを制限酵素S<sub>al</sub>I及びC<sub>la</sub>Iで消化し、T4 DNAポリメラーゼ(既出)にて平滑末端とした後アガロース電気泳動により、常法に従ってヒト尿トロノボモジュリンcDNAを含むDNA断片を分離、精製した。一方、前述のLK444-TM-DHFRを制限酵素E<sub>co</sub>R I及びNde Iで消化し、T4 DNAポリメラーゼ(既出)で平滑末端とした後、アガロース電気泳動により常法に従って、DHFR遺伝子を含むDNAを分離、精製した。このDNAと、先に調製したヒト尿トロノボモジュリンcDNAを含むDNA断片とを常法に従ってライゲーションさせ、pCDSR $\alpha$ -TM-DHFRを作製した。(第11図(a)～第11図(b))

### 実施例 3

#### トロノボモジュリンの発現

本実施例 1 において作製したプラスミド p K C R - T M - A 1 a および p K C R - T M - V a 1 を各々、C O S - 7 細胞 ( A T C C N o . C R L 1 6 5 1 ) に D E A E デキストラン法にてトランスフェクションし、トロンボモジュリンを発現した。すなわち、セミコンフルエントの C O S - 7 細胞を準備し Lauren らの方法 ( Lauren, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7575, (1981)) に従い約  $2 \times 10^5$  細胞あたり約  $1 \mu\text{g}$  の D N A を移入した。0.01% のアルブミンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (以下 D - M E 培地と略す) にて培養 3 日後、培養上清を回収し粗組換えヒト尿トロンボモジュリン液を得た。同様にトランスフェクションを行なった培養上清 10 L を分画分子量 3 万の限外濾過膜を使用して脱塩濃縮した。

p H を 7.3 に調整した後、60 °C で 15 分間処理した。リン酸緩衝液で予めコンディショニングしておいた D E A E セルローズ (ワットマン社製) の 300 m L カラムに培養上清を通過させて活性画分を吸着させ、コンディショニングに使用したものと同一緩衝液 750 m L で洗浄した後、酢酸緩衝液 (p H 4.0) で活性画分を溶出した。

溶出液は、分画分子量 3 万の限外濾過膜で濃縮し、2 M N a O H で p H 7.5 に調整し、0.1 M N a C l、1 m M ベンザミジン塩酸塩および 0.5 m M C a C l<sub>2</sub> を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (p H 7.5)

で予めコンディショニングしたD I P-トロンビン-ア  
ガロースの2. 5 m Lカラムを通過させて活性画分を吸  
着させた。次いで、コンディショニングに使用したもの  
と同じ緩衝液2. 5 m Lで洗浄した後、1 M N a C l、  
1 m M ベンザミジン塩酸塩および0. 5 m M E D T A  
を含む0. 0 2 M トリス-塩酸緩衝液 (p H 7. 5) で  
溶出し、この溶出液をコンディショニングに使用したも  
のと同じ緩衝液に対して透析後、再度前回と同様の条件  
にコンディショニングしたD I P-トロンビン-アガロ  
ースクロマトグラフィーで精製した。

溶出液は、分画分子量3万の限外濾過膜で濃縮し、あ  
らかじめ0. 1 4 M N a C l を含む0. 0 1 M リン  
酸緩衝液 (p H 7. 0) でコンディショニングしておい  
たセファクリルS-300 (ファルマシアファインケミ  
カル社製) の500 m Lカラムでゲル濾過して、目的と  
する活性画分を回収した。

以上の製造方法によりp K C R-T M-A 1 a および  
p K C R-T M-V a 1 由来の上清より精製組換えヒト  
尿トロンボモジュリンを各々約0. 5 m gを得た。本精  
製組換え型ヒト尿トロンボモジュリンは両者ともに非還  
元S D S-P A G Eにて単一バンドを示した。本品につ  
いて活性を調べたところ、両者ともに高い活性が示され  
た。

本発明ポリペプチド300  $\mu$  gをC. H. Hirsらの方  
法 (Methods in Enzymol. 11. 199. (1967)) に準じて

還元カルボキシメチル化した後、脱塩し、気相アミノ酸配列自動分析装置（アプライドバイオシステムズ社製、470A型）によりN末端アミノ酸配列を、またカルボキシペプチダーゼ法（Biochem. Biophys. Acta., 397, 443, (1975)）によりC末端アミノ酸配列分析を行ったところ、両者のN末端およびC末端のアミノ酸配列は72Kのヒト尿トロンボモジュリンのものと各々一致した。すなわち p K C R - T M - A 1 a 由来の上清から得られたポリペプチドのアミノ酸配列は、

N末端: Ala Pro Ala Glu Pro Gln

1 5

C末端: Leu Ala Arg

455

であり、p K C R - T M - V a 1 由来の上清より得られたポリペプチドのアミノ酸配列は、

N末端: Ala Pro Ala Glu Pro Gln

1 5

C末端: Leu Val Arg

455

であった。

#### 実施例 4

ヒト尿トロンボモジュリンの発現

本実施例 2 において作製したプラスミド p C D S R  $\alpha$  - T M - D H F R を以下に記載するように C H O 細胞に

エレクトロポレーション法 (D. Zerbib et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 129, 611 (1985) を改変) にてトランスフェクションし、組換えヒト尿トロンボモジュリンを発現させた。

すなわち、10% ウシ胎児血清 (株式会社日本生物材料センター) 含有 Ham's F12 (Flow 社製) (以下、培地-①と略記) を用いて、5% CO<sub>2</sub>-95% 空気下、37℃ にて2日間培養した CHO DXB11 細胞 (Urlaub, G. and Chasin, L. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 4216 (1980)) をトリプシン-EDTA 処理により分散させ、新鮮な培地-① 50 ml に懸濁させた。この細胞懸濁液を低速冷却遠心機 (国産遠心機株式会社) を用いて、1000 r. p. m.、5 分間 遠心分離操作を行なった。この操作後、上清を除去し、細胞をあらためてシュークロス含有リン酸緩衝液 (5.4 mM シュークロス / 7.0 mM リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 / 4.2 mM 塩化マグネシウム pH 7.4) 50 ml に懸濁し、1000 r. p. m.、5 分間の条件により遠心分離操作を行なった。上述のシュークロス含有リン酸緩衝液による懸濁、および遠心分離の操作をさらにもう一回行なった後、シュークロス含有リン酸緩衝液にて、 $1 \times 10^7$  細胞 / ml の細胞懸濁液とし、電気移入装置 ジーンパルサー TM (BIO-RAD 社) 専用キュベットに 0.4 ml 添加した。このキュベットにさらにシュークロス含有リン酸緩衝液にて 50  $\mu$ g / ml に調

製したプラスミド p C D S R  $\alpha$  - T M - D H F R を 0.4 mL 添加した。次にキュベットを氷中に 15 分間静置した後にジーンパルサーにて電気移入操作を行なった。つづいてキュベットを氷中に 10 分間静置後、培地 - ①にて  $1 \times 10^4$  細胞 / mL の細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液 10 mL を直径 10 cm 培養皿に添加し、5 % CO<sub>2</sub> - 95 % 空気下、37 °C にて培養した。培養開始 2 日後、培養皿中の培地を除去し、あらたに 10 % 非働化透析ウシ胎児血清（既出）含有 MEM  $\alpha$ （-）（リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド不含、G I B C O 社）（以下、培地 - ②と略記）10 mL を添加し、培養を継続した。2 - 4 日毎に新鮮な培地 - ②に交換しながら培養し、培養開始後 16 日目、あるいは 19 日目に、100 - 200 個の細胞から構成される単コロニーをベニシリンカップ法により採取した。採取した細胞を 96 ウェルマルチディッシュ（A / S N u n c 社）に移し、培地 - ②を用いて培養した。得られた各クローンをその増殖に合わせ、順次培養容器をかえて培養した。なおこの培養の過程において、培養細胞の一部を以下のように無血清培地中で培養し、得られる培養上清の組換え型トロンプモジュリン量を測定し、各クローンの組換え型トロンプモジュリン産生能を評価した。すなわち、培地 - ②を用いて  $4 \times 10^4$  細胞 / mL に調製した細胞懸濁液 3 mL を直径 35 mm 培養皿に添加し、5 % CO<sub>2</sub> - 95 % 空気下、37 °C にて 3 日間培養した。ついで、培養

液を除去し、P B S - T w e e nを用いて細胞を洗浄した後、さらに培地を5 K I U / m L アプロチニン（レバルゾン、持田製薬株式会社）含有M E M  $\alpha$ （-）3 m Lにかえて5 % C O <sub>2</sub> - 9 5 % 空気下、3 7 °Cにて2日間培養し、得られた培養上清の生物活性が高いものを、組換えトロンボモジュリンの高発現株として選択した。また、このようにして選択された組換えトロンボモジュリン高発現株を2 0 n M メソトレキセート（日本レダリー社）（以下、M T Xと略記）含有の培地-②にて $1 \times 10^4$ 細胞 / m L に調製し、直径1 0 c m の培養皿に1 0 m L 添加し、5 % C O <sub>2</sub> - 9 5 % 空気下、3 7 °Cにて培養した。この培養により得られる2 0 n M M T X 抵抗性細胞をペニシリンカップ法によりクローニングし、各クローンの組換えトロンボモジュリン産生能を評価し、組換えトロンボモジュリンの高発現株を選択した。得られた高発現株T M M - B 1 C の発現量は1 . 3  $\mu$  g / m L であった。培養上清中に含まれる組換えトロンボモジュリンは実施例3の方法で回収、精製し、同じく実施例3の方法でN末端及びC末端のアミノ酸配列を決定した。その結果、

N末端: Ala Pro Ala Glu Pro Gln

1

5

C末端: Leu Ala Arg

455

であることが確認された。

## 実施例 5

## 大腸菌での発現

本実施例 1 において作製したプラスミド p M 4 5 0 - T M - A 1 a あるいは p M 4 5 0 - T M - V a 1 にて形質転換された大腸菌 H B 1 0 1 株を  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン（以下、A p と略記）含有 L - 培地  $5 \text{ mL}$  にて終夜培養した。この培養液を 50 倍容の  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  A p および  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  トリプトファンを含む M 9 C A 培地に  $1/50$  容植菌し、 $37^\circ\text{C}$  にて約 3 時間培養して対数増殖後期まで増殖させた後、終濃度が  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように  $3\beta$ -インドールアクリル酸（和光純薬社製）を添加し、さらに 3 ~ 5 時間培養した。培養菌体を遠心分離（M R - 1 5, トミー精工社製）にて回収し、1 回生理食塩水にて洗浄し、次いで沈澱に、培養液の  $1/10$  容の 2 % ドデシル硫酸ナトリウム /  $1 \text{ mM}$  E D T A /  $10 \text{ mM}$  T r i s - H C l (p H 7.4) を加え菌体を分散後、 $90^\circ\text{C}$ , 5 分間処理にて溶菌させた。 $15,000 \text{ r. p. m.}$ , 10 分間遠心分離（既出）して不溶物を除去し、この上清を P B S に対して透析し溶菌液検体とした。

得られた 2 種の溶菌液の抗ヒト尿トロンボモジュリン抗体との反応性を調べた。すなわち、平底 96 穴マイクロタイタープレート（Immulon-600、Greiner 社製）の各ウェルに、 $0.1 \text{ M}$  炭酸ナトリウム緩衝液、p H 9.6 にて調整した  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の抗ヒト尿トロンボモジュ



リン抗体溶液（尿から取得した72Kのヒト尿トロンボモジュリンを家兎に感作して得た血清を硫酸塩析後、DEAE-セファロースカラムにて精製したものを）を100 $\mu$ L加え、4 $^{\circ}$ Cで16時間静置した後、0.05% Tween-20（Bio-Rad 製）を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.4（PBS-Tween）にて3回洗浄した。純水にて4倍に希釈したブロックエース（大日本製薬製）液を300 $\mu$ L加え37 $^{\circ}$ Cで1時間保温し、プレートの未吸着部分をブロッキングした後、PBS-Tweenで3回洗浄した。溶菌溶液を100 $\mu$ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間保温した後、PBS-Tweenにて3回洗浄し、次いで10 $\mu$ g/mLのビオチン化した抗ヒト尿トロンボモジュリン抗体溶液を100 $\mu$ L加え37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した。PBS-Tweenで3回洗浄した後、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Zymed lab. inc. 製）溶液を100 $\mu$ L加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した。PBS-Tweenで3回洗浄した後、クエン酸-リン酸緩衝液pH4.0で1回洗浄し、次いで0.003%過酸化水素水を含むクエン酸-リン酸緩衝液pH4.0にて1mg/mLの濃度に溶解した発色液（ABTS: (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)diammonium salt)）を200 $\mu$ L添加した。十分な吸光度が得られるまで反応させた後、各ウェルに21mg/mLのフッ化水素水溶液を50 $\mu$ L加えて反応を停止させ、マイクロタイタ

ープレートリーダーを用いて波長405nmにおける吸光度を測定した。

その結果、pM450-TM-A1aあるいはpM450-TM-Va1を保有した菌由来の溶菌液では発色が認められたが、これらと同様の培養および調整を行ったプラスミドpM450を保有するHB101株の溶菌液では全く発色が認められなかった。

#### 実施例 6

デリーションミュータント発現プラスミドの作製と発現

(1) デリーションミュータント発現ベクターの作製

DEL10発現ベクターは以下のごとく作製した。

第12図(a)に示した10mer及び24merからなるオリゴヌクレオチド(D5-16U及びD5-24L)を化学合成機(既出)にて作製した後、OPCカラム(既出)にて精製し、常法に従ってアニーリングさせて両端にKpnI及びEcoRIの切断面を有するDNA断片を得た。これと、実施例2-(1)で作製したpUC-TMのKpnI/EcoRI消化物から得た約4.5kbのDNA断片とを常法に従ってライゲーションさせ、ヒトトロポモジュリンのシグナルペプチド及びDEL10をコードし、3'末端に終止コドンが付加されたcDNAを含むプラスミドpUC-DEL10を作製した。これを更にEcoRI/MluIで消化し、

アガロースゲル電気泳動により常法に従って約 650 bp の大きさを有する DNA 断片を分取した後、実施例 2 - (2) で作製した p C D S R  $\alpha$  - T M の E c o R I / M l u I 消化物より同様に分取した約 4.5 kb の大きさを有する DNA 断片と常法に従ってライゲーションさせて p C D S R  $\alpha$  - D E L 10 を作製した (第 13 図 (a) ~ 第 13 図 (b))。

一方、ヒト尿トロンボモジュリンの C 末アミノ酸 49 個が欠失した変異型の組換えヒト尿トロンボモジュリン (以下 D E L 49 と略す) 発現ベクターは以下のごとく作製した。

第 12 図 (b) に示したいずれも 14 mer からなるオリゴヌクレオチド (D 10 - 14 U 及び D 10 - 14 L) を化学合成機 (既出) にて作製した後 O P C カラム (既出) にて精製し、常法に従ってアニーリングさせて両端に N h e I 及び E c o R I の切断面を有する DNA 断片を得た。これと実施例 1 - (2) で作製した p C D S R  $\alpha$  - T M の E c o R I / N h e I 消化物より調製した約 5 kb の DNA 断片とを常法に従ってライゲーションさせ所望の c D N A を含むプラスミド p C D S R  $\alpha$  - D E L 49 を作製した。(第 13 図 (a) ~ 第 13 図 (b))

## (2) 動物細胞での発現

実施例 2 - (2) において作製した p C D S R  $\alpha$  - T M と、実施例 6 - (1) において作製した p C D S R  $\alpha$

- 50 -

- D E L 1 0 及び p C D S R  $\alpha$  - D E L 4 9 を C O S I 細胞へ導入し、各々 r u T M - A 1 a、D E L 1 0 及び D E L 4 9 を発現させた。即ち、p C D S R  $\alpha$  - T M または p C D S R  $\alpha$  - D E L 1 0 または p C D S R  $\alpha$  - D E L 4 9 0.5  $\mu$ g を 5  $\mu$ L の T E に溶解し、0.2 mg / mL D E A E - デキストラン及び 50 mM T r i s - H C l (p H 7.4) を含む D - M E 培地 700  $\mu$ L と混ぜ、D N A - D E A E デキストラン混合液を作製した。セミコンフルエントな状態にまで直径 3.5 cm プレートに培養した C O S I 細胞に D N A - D E A E - デキストラン混合液を滴下し、37  $^{\circ}$ C、5% C O <sub>2</sub> 存在下で培養した。4 時間後、D N A - D E A E - デキストラン混合液を除去し、1% のウシ胎児血清 (既出) を含む D - M E 培地を添加した。37  $^{\circ}$ C、5% C O <sub>2</sub> 存在下にて 48 ~ 96 時間培養後、培養上清を回収し実験例 2 の方法に準じてプロテイン C 活性化能を測定して比較した。その結果、D E L 4 9 には十分な生物活性が認められなかったが、r u T M - A 1 a 及び D E L 1 0 には生物活性が認められた。結果を第 4 表に示す。

第 4 表

	活性 <sup>*1</sup>
r u T M - A l a	3 . 8
D E L 1 0	4 . 1
ヒト胎盤トロンボモジュリン	1 . 0

\*1: ヒト胎盤トロンボモジュリンの活性を1とする

次に本発明のポリペプチドを含有する製剤の実施例を示す。

## 実施例 - 7

r u T M - A l a	2 0 . 0 m g
精製ゼラチン	5 0 . 0 m g
リン酸ナトリウム	3 4 . 8 m g
塩化ナトリウム	8 1 . 8 m g
マンニトール	2 5 . 0 m g

上記成分を注射用蒸留水 1 0 m L に溶解し、無菌濾過した後に 1 . 0 m L ずつ無菌バイアルに分注し、凍結乾燥して、注射用製剤を調整した。

## 実施例 - 8

r u T M - A l a	4 0 . 0 m g
アルブミン	2 0 . 0 m g
リン酸ナトリウム	3 4 . 8 m g

- 52 -

塩化ナトリウム	81.8 mg
---------	---------

マンニトール	25.0 mg
--------	---------

上記の各成分を秤量し、実施例 - 7 と同様の方法にて凍結乾燥製剤を調整した。

#### 実施例 - 9

DEL10	20.0 mg
-------	---------

精製ゼラチン	50.0 mg
--------	---------

リン酸ナトリウム	34.8 mg
----------	---------

塩化ナトリウム	81.8 mg
---------	---------

マンニトール	25.0 mg
--------	---------

上記の各成分を秤量し、実施例 - 7 と同様の方法にて凍結乾燥製剤を調整した。

#### (参考例)

##### ヒト胎盤トロンボモジュリンの取得例

特開昭 60 - 199819 号の方法に準じ、ヒト胎盤より、トロンボモジュリンを精製した。すなわち、ヒト胎盤 12 kg (30 個分) を、0.25 M シュークロス、1 mM ベンザミジン塩酸塩を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄した後、肉挽機にて破碎し、均質化した。均質化した懸濁液を 3000 r.p.m. で 40 分間遠心分離し、得られた沈澱物を上記緩衝液に懸濁させ、10 分間攪拌後、再度遠心分離して沈澱物を分取した。以上の操作を、1 回あたり 20 L の緩衝液を用いて、合計 3 回繰り返し行い、分取した沈澱物を、

0.25 M シュークロース、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 % (V/V) トリトン X-100 (シグマ社製) を含む 60 L の 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で抽出した。得られた抽出液中の総タンパク質量は 46.7 g であった (Lowry 法による、以下同じ)。粗抽出液 60 L を、0.1 M NaCl、0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 % (V/V) トリトン X-100 を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 でコンディショニングした DIP-トロニン-アガロースカラム (4  $\phi$   $\times$  16 cm) に吸着させ、コンディショニングに用いたのと同じ緩衝液 2 L で洗浄した。次いで、1 M NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 % (V/V) トリトン X-100 を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で溶出した。溶出量は 650 mL であり、得られた蛋白質量は 1.7 g であった。この溶出液を限外濾過器 (ミリボア社製、3 万 cut off) を使用して脱塩濃縮し、再度上記と同様にコンディショニングした同容の DIP-トロニン-アガロースカラムに吸着させた。次いで、0.4 M NaCl、0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 % トリトン X-100 を含む 150 mL の 0.02 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄した後、0.1 mM EDTA、1 mM ベンザミジン塩酸塩および 0.5 % トリトン X-100 を含む 0.

0.2 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5 に、NaCl (0.4 ~ 1 M) を加えた溶液を用いて、濃度勾配法により溶出し、30 mL 毎に分画した。目的とする分画の液量は合計で1290 mL で、蛋白質量は68 mg であった。次いで、この溶出液を限外濾過器（ミリポア社製、3万 cut off）を使用して脱塩濃縮し、予め0.05% トリトンX-100、0.14 M NaCl を含む0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0 でコンディショニングしたS-300（ファルマシア社製）カラム（2.6  $\phi$   $\times$  90 cm）でゲル濾過し、目的とする画分を捕集した。取得したヒト胎盤トロポモジュリンは蛋白質量として3.1 mg であった。



### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明で用いられるプローブの塩基配列の模式図である。

第2図は、本発明ポリペプチドをコードするDNAを含有する2.5 kb cDNAの制限酵素地図である。

第3図(a)～第3図(m)は、本発明ポリペプチドをコードするDNAを含有する2.5 kb cDNAの塩基配列とアミノ酸配列とを示す模式図である。

第4図(a)～第4図(b)は、本発明の哺乳動物細胞発現用プラスミドpKCR-TM-AlaおよびpKCR-TM-Valの作製手順を示す図である。

第5図(a)～第5図(b)は、本発明のプラスミド構築に使用したオリゴヌクレオチドを示す図である。

第6図(a)～第6図(b)は、本発明の大腸菌発現用プラスミドpM450-TM-AlaおよびpM450-TM-Valの作製手順を示す図である。

第7図は、本発明のプラスミド構築に使用したオリゴヌクレオチドを示す図である。

第8図は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドpUC-TMの作製手順を示す図である。

第9図(a)～第9図(b)は、本発明のポリペプチドfru-TM-AlaをコードするDNAの塩基配列を示す図である。

第10図(a)～第10図(b)は、本発明の哺乳動

物細胞発現用プラスミド L K - 4 4 4 - T M - D H F R  
の作製手順を示す図である。

第 1 1 図 ( a ) ~ 第 1 1 図 ( b ) は、本発明の哺乳動物細胞発現用プラスミド p C D S R  $\alpha$  - T M - D H F R  
の作製手順を示す図である。

第 1 2 図は、本発明のデリーションミュータント発現  
プラスミド p C D S R  $\alpha$  - D E L 1 0 および p C D S R  
 $\alpha$  - D E L 4 9 構築に使用したオリゴヌクレオチドを示  
す図である。

第 1 3 図 ( a ) ~ 第 1 3 図 ( b ) は、本発明の哺乳動物細胞発現用プラスミド p C D S R  $\alpha$  - D E L 1 0 およ  
び p C D S R  $\alpha$  - D E L 4 9 の作製手順を示す図である。

### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは、トロンビンと結合することにより、トロンビンの作用を打ち消して血液凝固抑制および血小板凝集抑制作用を発揮すると同時に、プロテインCを活性化して血液凝固抑制作用、血栓溶解作用をも発現するため、血栓形成抑制、血栓溶解、抗DICなど、広範囲にわたる血液凝固亢進に係わる疾患に対する治療効果が期待される。特に、プロテインC活性化作用が優れるため、より副作用が軽減されることが期待される。

また、本発明のポリペプチドは、初めて遺伝子工学で産生された物質である。従って、血液凝固亢進に係わる血栓症やDICなどの疾患に対する治療薬あるいは予防薬として医薬品に応用した際に、より強力な効果が期待でき、あるいは、より少量の投与で同程度の効果が期待されるため、副作用発現の危険性がより少なく、また、より経済的に使用することができる。また、現在では治療が困難である疾患の治療が可能になるなど、全く新しい効果も期待される。

また、本発明のポリペプチドは、胎盤・肺などの組織抽出ヒトトロンボモジュリンの可溶化に必要とされる界面活性剤を使用する必要がないため、医薬品としてより安全に使用することができる。

本発明のポリペプチドは、上記のような医薬品としての用途以外に、人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用器材の表面に架橋剤などを用いて結合・吸着させて、

血液凝固を防ぐ目的でも用いることができる。

国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) 持田製薬株式会社  
代表者 持田 英 殿  
寄託者 あて名 ㊤ 160  
東京都新宿区四谷1丁目7番地  
持田製薬株式会社内

## I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

TMM-B1C

(受託番号)

微工研条寄第 3463 号

( FERM BP- 3463 )

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☒ 科学的性質

☐ 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 3 年 6 月 25 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

## IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称: Fermentation Research Institute  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 鈴木智雄  
Tomoo Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)  
1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN

平成 3 年 (1991) 6 月 25 日

X<sub>1</sub> Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu

10

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr

20

25

Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg

30

35

Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser Ser Val Ala Ala

40

45

50

Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly

55

60

Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu

65

70

Pro Pro Gly Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro

75

80 .

85

Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn

90

95

Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn

100

105

110

Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val

115

120

Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile

125

130

- 60 -

Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys Ala Asp Gly  
135 140 145  
Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg  
150 155  
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
160 165 170  
Val Ser Ile Thr Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg  
175 180  
Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser  
185 190  
Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys  
195 200 205  
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala  
210 215  
Arg Glu Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu  
220 225 230  
Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro  
235 240  
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala  
245 250  
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala  
255 260 265  
Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys  
270 275

- 61 -

Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys  
280 285 290  
Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln  
295 300  
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu  
305 310  
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln  
315 320 325  
Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp  
330 335  
Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro  
340 345 350  
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro  
355 360  
Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu  
365 370  
Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys  
375 380 385  
Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp  
390 395  
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro  
400 405 410  
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr  
415 420



- 62 -

Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser  
                   425                                  430

Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys  
 435                                  440                                  445

Y<sub>1</sub>[式中 X<sub>1</sub>は下記式:]

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu  
                                   -15                                  -10

Ala Gly Leu Gly Phe Pro Ala Pro Ala  
           -5                                  -1      1

で表される配列、またはその N 末端から任意数もしくは  
 すべてのアミノ酸が欠失した配列を示し、Y<sub>1</sub>は下記式:

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Z Arg His  
                                   450                                  455

[但し、Z は Val または Ala]

で表される配列またはその C 末端から任意数もしくは  
 すべてのアミノ酸が欠失した配列を示す]

で表されるアミノ酸配列を有し、遺伝子組換え手法によ  
 って得られる、当該配列中のアミノ酸の少なくとも1つ  
 が糖鎖を有してもよいことを特徴とするポリペプチド。

2. X<sub>1</sub>は下記式:

Ala Pro Ala

1

で表される配列、Y<sub>1</sub>は下記式:

- 63 -

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Z Arg

450

455

[但し、Z は Val または Ala]

で表されるアミノ酸配列で、当該配列中のアミノ酸の少なくとも1つが糖鎖を有してもよい請求の範囲第1項記載のポリペプチド。

3.  $X_1$ は下記式:

Ala Pro Ala

1

で表される配列、 $Y_1$ のすべてのアミノ酸が欠失したアミノ酸配列で、当該配列中のアミノ酸の少なくとも1つが糖鎖を有してもよい請求の範囲第1項記載のポリペプチド。

4. 当該配列中のアミノ酸の少なくとも1つが糖鎖を有している請求の範囲第1項ないし第3項記載のポリペプチド。

5. 当該配列中のアミノ酸が糖鎖を有していない請求の範囲第1項ないし第3項記載のポリペプチド。

6. 請求の範囲第1項ないし第5項記載のポリペプチドをコードするDNA。

## 7. 次式:

X <sub>2</sub>	GAGCCGC	AGCCGGGTGG	CAGCCAGTGC	GTCGAGCACG	100
	ACTGCTTCGC	GCTCTACCCG	GGCCCCGCGA	CCTTCCTCAA	140
	TGCCAGTCAG	ATCTGCGACG	GACTGCGGGG	CCACCTAATG	180
	ACAGTGCGCT	CCTCGGTGGC	TGCCGATGTC	ATTTCCTTGC	220
	TACTGAACGG	CGACGGCGGC	GTTGGCCGCC	GGCGCCTCTG	260
	GATCGGCCTG	CAGCTGCCAC	CCGGCTGCGG	CGACCCCAAG	300
	CGCCTCGGGC	CCCTGCGCGG	CTTCCAGTGG	GTTACGGGAG	340
	ACAACAACAC	CAGCTATAGC	AGGTGGGCAC	GGCTCGACCT	380
	CAATGGGGCT	CCCCTCTGCG	GCCCGTTGTG	CGTCGCTGTC	420
	TCCGCTGCTG	AGGCCACTGT	GCCCAGCGAG	CCGATCTGGG	460
	AGGAGCAGCA	GTGCGAAGTG	AAGGCCGATG	GCTTCCTCTG	500
	CGAGTTCCAC	TTCCAGCCA	CCTGCAGGCC	ACTGGCTGTG	540
	GAGCCCGGCG	CCGCGGCTGC	CGCCGTCTCG	ATCACCTACG	580
	GCACCCCGTT	CGCGGCCCGC	GGAGCGGACT	TCCAGGCGCT	620
	GCCGGTGGGC	AGCTCCGCCG	CGGTGGCTCC	CCTCGGCTTA	660
	CAGCTAATGT	GCACCGCGCC	GCCCGGAGCG	GTCCAGGGGC	700
	ACTGGGCCAG	GGAGGCGCCG	GGCGCTTGGG	ACTGCAGCGT	740
	GGAGAACGGC	GGCTGCGAGC	ACGCGTGCAA	TGCGATCCCT	780
	GGGGCTCCCC	GCTGCCAGTG	CCCAGCCGGC	GCCGCCCTGC	820
	AGGCAGACGG	GCGCTCCTGC	ACCGCATCCG	CGACGCAGTC	860
	CTGCAACGAC	CTCTGCGAGC	ACTTCTGCGT	TCCCAACCCC	900
	GACCAGCCGG	GCTCCTACTC	GTGCATGTGC	GAGACCGGCT	940
	ACCGGCTGGC	GGCCGACCAA	CACCGGTGCG	AGGACGTGGA	980
	TGACTGCATA	CTGGAGCCCA	GTCCGTGTCC	GCAGCGCTGT	1020

GTCAACACAC AGGGTGGCTT CGAGTGCCAC TGCTACCCTA 1060  
 ACTACGACCT GGTGGACGGC GAGTGTGTSG AGCCCGTGGA 1100  
 CCCGTGCTTC AGAGCCAACT GCGAGTACCA GTGCCAGCCC 1140  
 CTGAACCAAA CTAGCTACCT CTGCGTCTGC GCCGAGGGCT 1180  
 TCGCGCCCAT TCCCCACGAG CCGCACAGGT GCCAGATGTT 1220  
 TTGCAACCAG ACTGCCTGTC CAGCCGACTG CGACCCCAAC 1260  
 ACCCAGGCTA GCTGTGAGTG CCCTGAAGGC TACATCCTGG 1300  
 ACGACGGTTT CATCTGCACG GACATCGACG AGTGCGAAAA 1340  
 CGGCGGCTTC TGCTCCGGGG TGTGCCACAA CCTCCCCGGT 1380  
 ACCTTCGAGT GC Y<sub>2</sub> 1392

[但し、式中 S は G または C, X<sub>2</sub> は下記式:

ATGCTTGGGG TCCTGGTCCT TGGCGCGCTG GCCCTGGCCG 40  
 GCCTGGGGTT CCCCGCWCCC GCA 63

[但し、W は T または A]

で表される配列、またはその 5' 末端から 3 塩基単位で  
 任意数もしくはすべての塩基が欠失した配列を示し、Y<sub>2</sub>  
 は下記式:

ATCTGCGGGC CCGACTCGGC CCTTGYCCGC CAC 1425

[但し、Y は T または C]

で表される配列、またはその 3' 末端から 3 塩基単位で  
 任意数もしくはすべての塩基が欠失した配列を示す]

で表される塩基配列を有することを特徴とする請求の範  
 囲第 6 項記載の DNA。

8. X<sub>2</sub> は下記式:

GCWCCCGCA

63

[但し、W は T または A]

で表される配列、Y<sub>2</sub>は下記式：ATCTGCGGGC CCGACTCGGC CCTTG<sub>Y</sub>CCGC

1422

[但し、Y<sub>2</sub>は T または C]

で表される塩基配列を有する請求の範囲第7項記載の DNA。

9. X<sub>2</sub>は下記式：

GCWCCCGCA

63

[但し、W は T または A]

で表される配列、Y<sub>2</sub>のすべての塩基が欠失した塩基配列を有する請求の範囲第7項記載の DNA。

10. 下記より選ばれる少なくとも1つの工程を行うことを特徴とする、請求の範囲第1項ないし請求の範囲第5項記載のポリペプチドの生産方法。

- a) 当該ポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA を得る工程、
- b) 発現用ベクターに当該 DNA を組み入れて、当該 DNA を含む複製可能な組換え DNA を得る工程、
- c) 当該組換え DNA で宿主細胞を形質転換させて、当該ポリペプチドを発現し得る形質転換体を得る工程、
- d) 当該形質転換体を培養して、当該ポリペプチドを生産せしめ、培養混合物から当該ポリペプチドを回収する

工程。

1 1. 宿主細胞が、真核生物細胞である請求の範囲第 10 項記載のポリペプチドの生産方法。

1 2. 宿主細胞が、原核生物細胞である請求の範囲第 10 項記載のポリペプチドの生産方法。

1 3. 請求の範囲第 1 項記載のポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤。

1 4. 請求の範囲第 2 項記載のポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤。

1 5. 請求の範囲第 3 項記載のポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤。

1 6. 請求の範囲第 4 項記載のポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤。

1 7. 請求の範囲第 5 項記載のポリペプチドを有効成分

として含有することを特徴とする、血液凝固亢進に係わる疾患の予防及び治療剤。

1/32

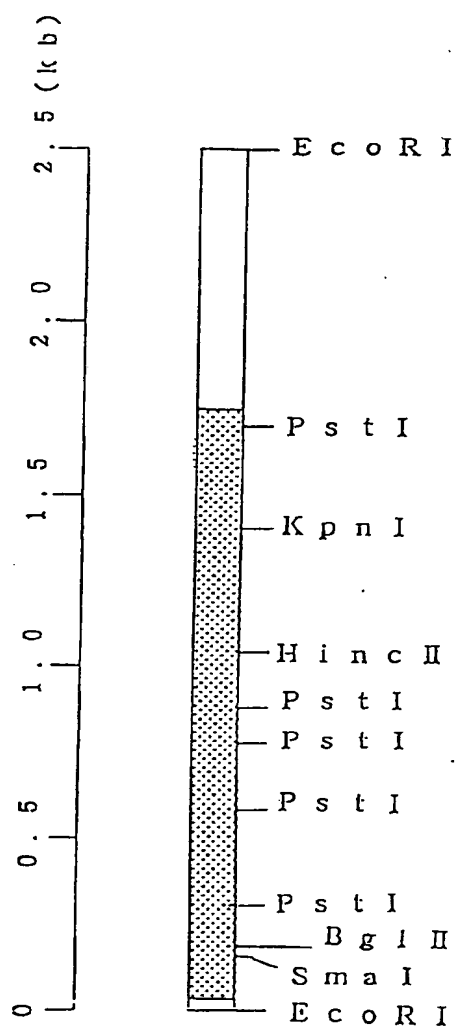
第 1 図

G C A A A A C A A T    C A T G T T C    1 7

G C G A A G C A G T    C G T G C T C    1 7



2/32



3/32

## 第 3 図 ( a )

GCTTTCCCCG GCGCCTGCAC GCGGCGCGCC TGGGTAAC ATG 41  
Met

CTT GGG GTC CTG GTC CTT GGC GCG CTG GCC CTG 74  
Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu  
-15 -10

GCC GGC CTG GGG TTC CCC GCA CCC GCA GAG CCG 107  
Ala Gly Leu Gly Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro  
-5 -1 1 5

CAG CCG GGT GGC AGC CAG TGC GTC GAG CAC GAC 140  
Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp  
10 15

TGC TTC GCG CTC TAC CCG GGC CCC GCG ACC TTC 173  
Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe  
20 25

4/32

## 第 3 図 (b)

CTC AAT GCC AGT CAG ATC TGC GAC GGA CTG CGG 206  
Leu Asn Ala Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg  
30 35

GGC CAC CTA ATG ACA GTG CGC TCC TCG GTG GCT 239  
Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser Ser Val Ala  
40 45

GCC GAT GTC ATT TCC TTG CTA CTG AAC GGC GAC 272  
Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp  
50 55 60

GGC GGC GTT GGC CGC CGG CGC CTC TGG ATC GGC 305  
Gly Gly Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly  
65 70

CTG CAG CTG CCA CCC GGC TGC GGC GAC CCC AAG 338  
Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys Gly Asp Pro Lys  
75 80

5/32

## 第 3 区 ( c )

CGC CTC GGG CCC CTG CGC GGC TTC CAG TGG GTT 371

Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val

85

90

ACG GGA GAC AAC AAC ACC AGC TAT AGC AGG TGG 404

Thr Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp

95

100

GCA CGG CTC GAC CTC AAT GGG GCT CCC CTC TGC 437

Ala Arg Leu Asp Leu Asn Gly Ala Pro Leu Cys

105

110

115

GGC CCG TTG TGC GTC GCT GTC TCC GCT GCT GAG 470

Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu

120

125

GCC ACT GTG CCC AGC GAG CCG ATC TGG GAG GAG 503

Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu

130

135

6/32

第 3 ☒ (d)

CAG CAG TGC GAA GTG AAG GCC GAT GGC TTC CTC 536  
Gln Gln Cys Glu Val Lys Ala Asp Gly Phe Leu  
140 145

TGC GAG TTC CAC TTC CCA GCC ACC TGC AGG CCA 569  
Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg Pro  
150 155

CTG GCT GTG GAG CCC GGC GCC GCG GCT GCC GCC 602  
Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala  
160 165 170

GTC TCG ATC ACC TAC GGC ACC CCG TTC GCG GCC 635  
Val Ser Ile Thr Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala  
175 180

CGC GGA GCG GAC TTC CAG GCG CTG CCG GTG GGC 668  
Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro Val Gly  
185 190

7/32

## 第 3 図 ( e )

AGC TCC GCC GCG GTG GCT CCC CTC GGC TTA CAG 701  
Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln  
195 200

CTA ATG TGC ACC GCG CCG CCC GGA GCG GTC CAG 734  
Leu Met Cys Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln  
205 210

GGG CAC TGG GCC AGG GAG GCG CCG GGC GCT TGG 767  
Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala Trp  
215 220 225

GAC TGC AGC GTG GAG AAC GGC GGC TGC GAG CAC 800  
Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His  
230 235

GCG TGC AAT GCG ATC CCT GGG GCT CCC CGC TGC 833  
Ala Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys  
240 245

8/32

## 第 3 図 ( r )

CAG	TGC	CCA	GCC	GGC	GCC	GCC	CTG	CAG	GCA	GAC	866
Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Ala	Asp	
		250					255				

GGG	CGC	TCC	TGC	ACC	GCA	TCC	GCG	ACG	CAG	TCC	899
Gly	Arg	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Gln	Ser	
		260					265				

TGC	AAC	GAC	CTC	TGC	GAG	CAC	TTC	TGC	GTT	CCC	932
Cys	Asn	Asp	Leu	Cys	Glu	His	Phe	Cys	Val	Pro	
270						275				280	

AAC	CCC	GAC	CAG	CCG	GGC	TCC	TAC	TCG	TGC	ATG	965
Asn	Pro	Asp	Gln	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Met	
				285						290	

TGC	GAG	ACC	GGC	TAC	CGG	CTG	GCG	GCC	GAC	CAA	998
Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Ala	Asp	Gln	
				295						300	

9/32

## 第 3 図 (g)

CAC CGG TGC GAG GAC GTG GAT GAC TGC ATA CTG 1031  
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu  
305 310

GAG CCC AGT CCG TGT CCG CAG CGC TGT GTC AAC 1064  
Glu Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn  
315 320

ACA CAG GGT GGC TTC GAG TGC CAC TGC TAC CCT 1097  
Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro  
325 330 335

AAC TAC GAC CTG GTG GAC GGC GAG TGT GTG GAG 1130  
Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu  
340 345

CCC GTG GAC CCG TGC TTC AGA GCC AAC TGC GAG 1163  
Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu  
350 355



10/32

## 第 3 図 (h)

TAC CAG TGC CAG CCC CTG AAC CAA ACT AGC TAC 1196  
Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr  
360 365

CTC TGC GTC TGC GCC GAG GGC TTC GCG CCC ATT 1229  
Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile  
370 375

CCC CAC GAG CCG CAC AGG TGC CAG ATG TTT TGC 1262  
Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys  
380 385 390

AAC CAG ACT GCC TGT CCA GCC GAC TGC GAC CCC 1295  
Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro  
395 400

AAC ACC CAG GCT AGC TGT GAG TGC CCT GAA GGC 1328  
Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly  
405 410

11/32

## 第 3 図 ( i )

TAC ATC CTG GAC GAC GGT TTC ATC TGC ACG GAC 1361  
Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp  
415 420

ATC GAC GAG TGC GAA AAC GGC GGC TTC TGC TCC 1394  
Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser  
425 430

GGG GTG TGC CAC AAC CTC CCC GGT ACC TTC GAG 1427  
Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu  
435 440 445

TGC ATC TGC GGG CCC GAC TCG GCC CTT GCC CGC 1460  
Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg  
450 455

CAC ATT GGC ACC GAC TGT GAC TCC GGC AAG GTG 1493  
His Ile Gly Thr Asp Cys Asp Ser Gly Lys Val  
460 465

12/32

## 第 3 図 ( j )

GAC GGT GGC GAC AGC GGC TCT GGC GAG CCC CCG 1526  
Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro  
470 475

CCC AGC CCG ACG CCC GGC TCC ACC TTG ACT CCT 1559  
Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro  
480 485

CCG GCC GTG GGG CTC GTG CAT TCG GGC TTG CTC 1592  
Pro Ala Val Gly Leu Val His Ser Gly Leu Leu  
490 495 500

ATA GGC ATC TCC ATC GCG AGC CTG TGC CTG GTG 1625  
Ile Gly Ile Ser Ile Ala Ser Leu Cys Leu Val  
505 510

GTG GCG CTT TTG GCG CTC CTC TGC CAC CTG CGC 1658  
Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys His Leu Arg  
515 520

13/32

## 第 3 図 (k)

AAG AAG CAG GGC GCC GCC AGG GCC AAG ATG GAG 1691  
Lys Lys Gln Gly Ala Ala Arg Ala Lys Met Glu  
525 530

TAC AAG TGC GCG GCC CCT TCC AAG GAG GTA GTG 1724  
Tyr Lys Cys Ala Ala Pro Ser Lys Glu Val Val  
535 540

CTG CAG CAC GTG CGG ACC GAG CGG ACG CCG CAG 1757  
Leu Gln His Val Arg Thr Glu Arg Thr Pro Gln  
545 550 555

AGA CTC TGA GCGG CCTCCGTCCA GGAGCCTGGC 1790  
Arg Leu \*\*\*

TCCGTCCAGG AGCCTGTGCC TCCTCACCCC CAGCTTTGCT 1830

ACCAAAGCAC CTTAGCTGGC ATTACAGCTG GAGAAGACCC 1870

TCCCCGCACC CCCCAGCTG TTTTCTTCTA TTCCATGGCT 1910

14/32

## 第 3 図 ( 1 )

AACTGGCGAG GGGGTGATTA GAGGGAGGAG AATGAGCCTC	1950
GGCCTCTTCC GTGACGTCAC TGGACCACTG GGCAATGATG	1990
GCAATTTTGT AACGAAGACA CAGACTGCCA TTTGTCCCAG	2030
GTCCTCACTA CCGGGCGCAG GAGGGTGAGC GTTATTGGTC	2070
GGCAGCCTTC TGGGCAGACC TTGACCTCGT GGGCTAGGGA	2110
TGACTAAAAT ATTTATTTTT TTAAAGTATT TAGGTTTTTG	2150
TTTGTTTCCT TTGTTCTTAC CTGTATGTCT CCAGTATCCA	2190
CTTTGCACAG CTCTCCGGTC TCTCTCTCTC TACAACTCC	2230
EACTTGTCAT GTGACAGGTA AACTATCTTG GTGAATTTTT	2270
TTTTCTAGC CCTCTCACAT TTATGAAGCA AGCCCCACTT	2310
ATTCCCCATT CTTCTAGTT TTCTCCTCCC AGGAACTGGG	2350

15/32

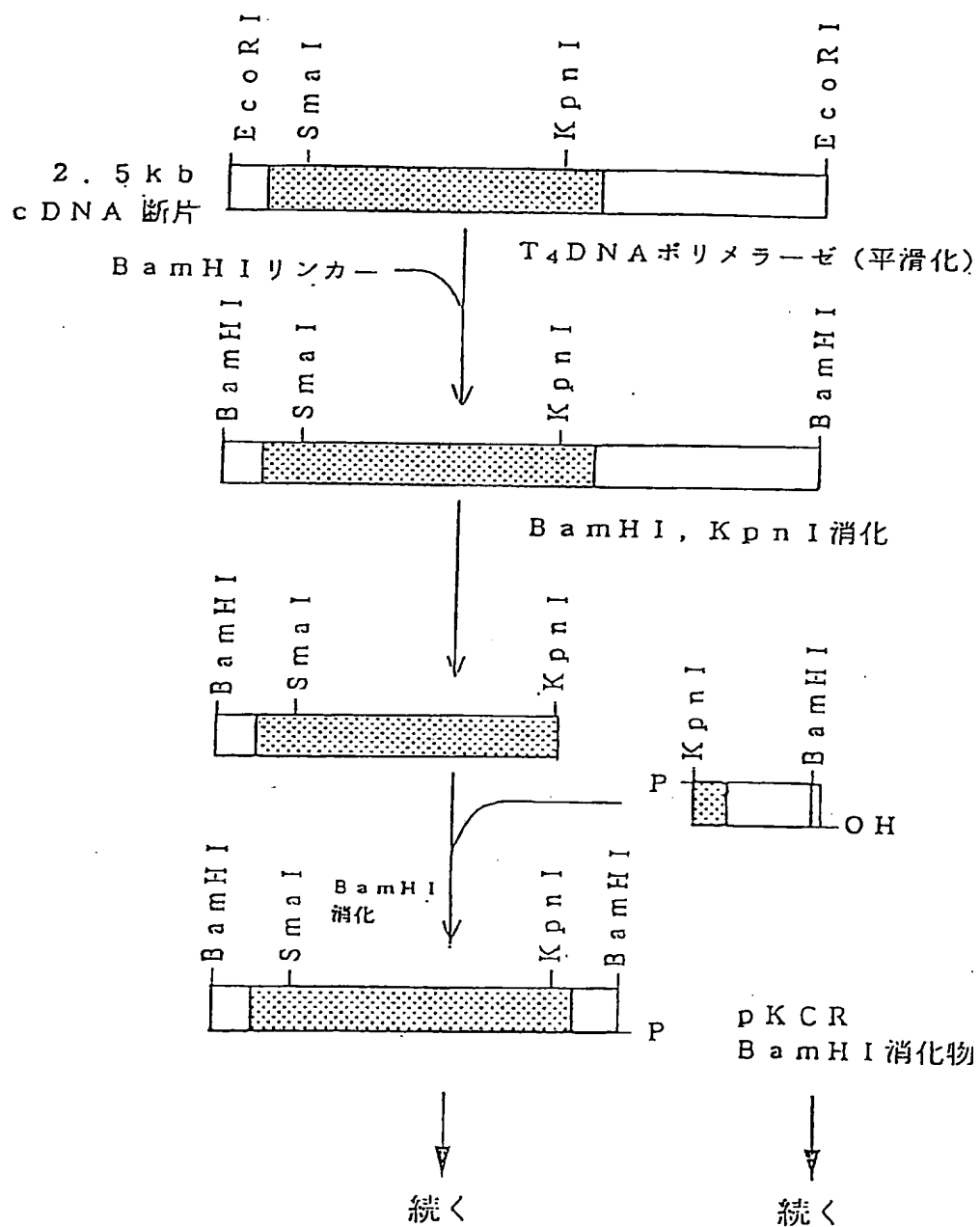
## 第 3 図 (m)

CCAACTCACC TGAGTCACCC TACCTGTGCC TGACCCTACT 2390

TCTTTTGCTC TTAGCTGTCT GCTCAGACAG AACCCCTACA 2430

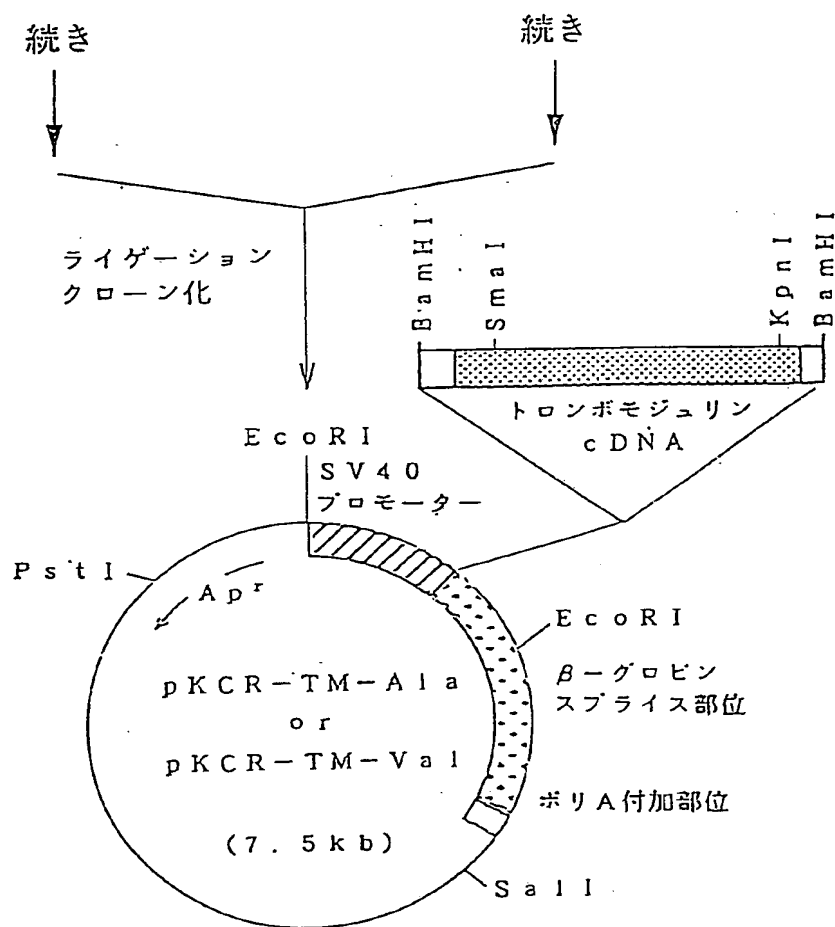
TGAAACAGAA AAAAAACAC TAAAAATAAA AAT 2463

第 4 ☒ (a)



17/32

第 4 図 (b)





18/32

## 第 5 図 ( a )

p K C R - T M - A l a 作製用

49 mer	CTTCGAGTGC ATCTGCGGGC CCGACTCGGC	30
	CCTTGCCCGC TAGGATCCC	49

53 mer	GGGATCCTAG CGGGCAAGGG CCGAGTCGGG	30
	CCCGCAGATG CACTCGAAGG TAC	53

p K C R - T M - V a l 作製用

49 mer	CTTCGAGTGC ATCTGCGGGC CCGACTCGGC	30
	CCTTGTCGGC TAGGATCCC	49

53 mer	GGGATCCTAG CGGACAAGGG CCGAGTCGGG	30
	CCCGCAGATG CACTCGAAGG TAC	53

19/32

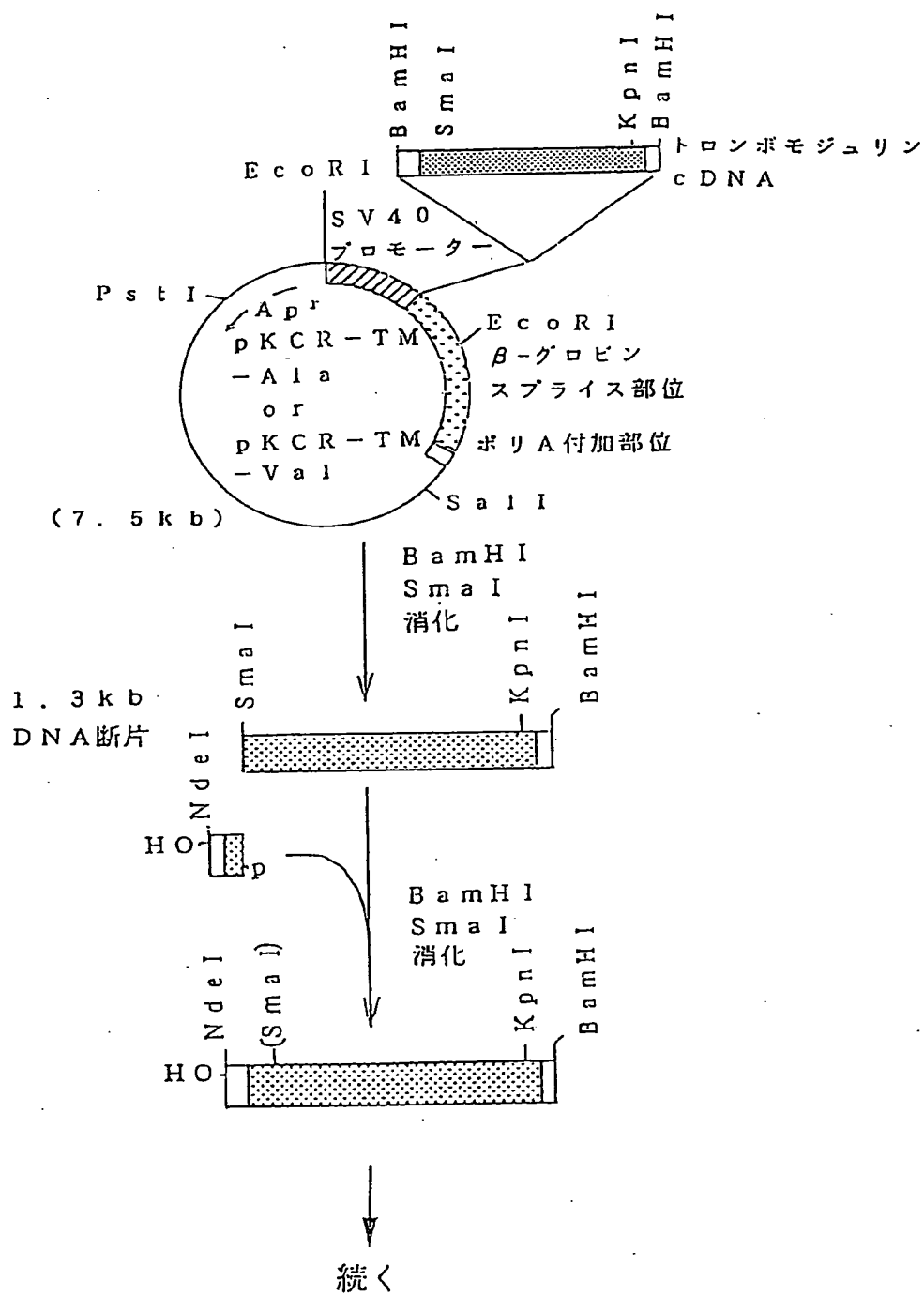
## 第 5 図 ( b )

p M 4 5 0 - T M - A l a お よ び p M 4 5 0 - T M -  
V a l 作 製 用

69 mer	TATGGCACCA GCAGAACCCAC AACCCAGGTGG	30
	AAGTCAATGT GTAGAACATG ATTGTTTTGC	60
	ACTATATCC	69
67 mer	GGATATAGTG CAAAACAATC ATGTTCTACA	30
	CATTGACTTC CACCTGGTTG TGGTTCTGCT	60
	GGTGCCA	67

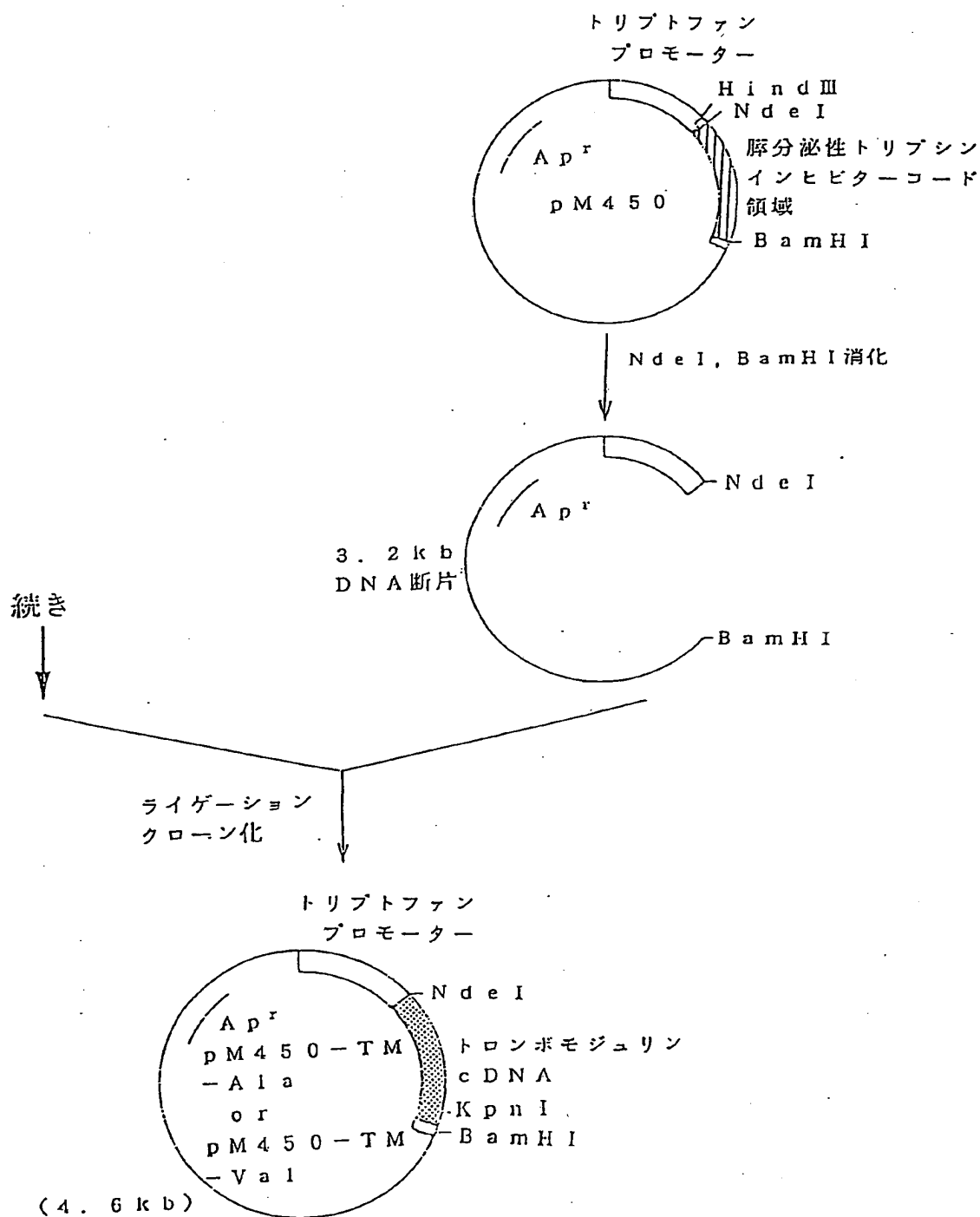
20/32

## 第 6 図 (a)



21/32

## 第 6 図 (b)



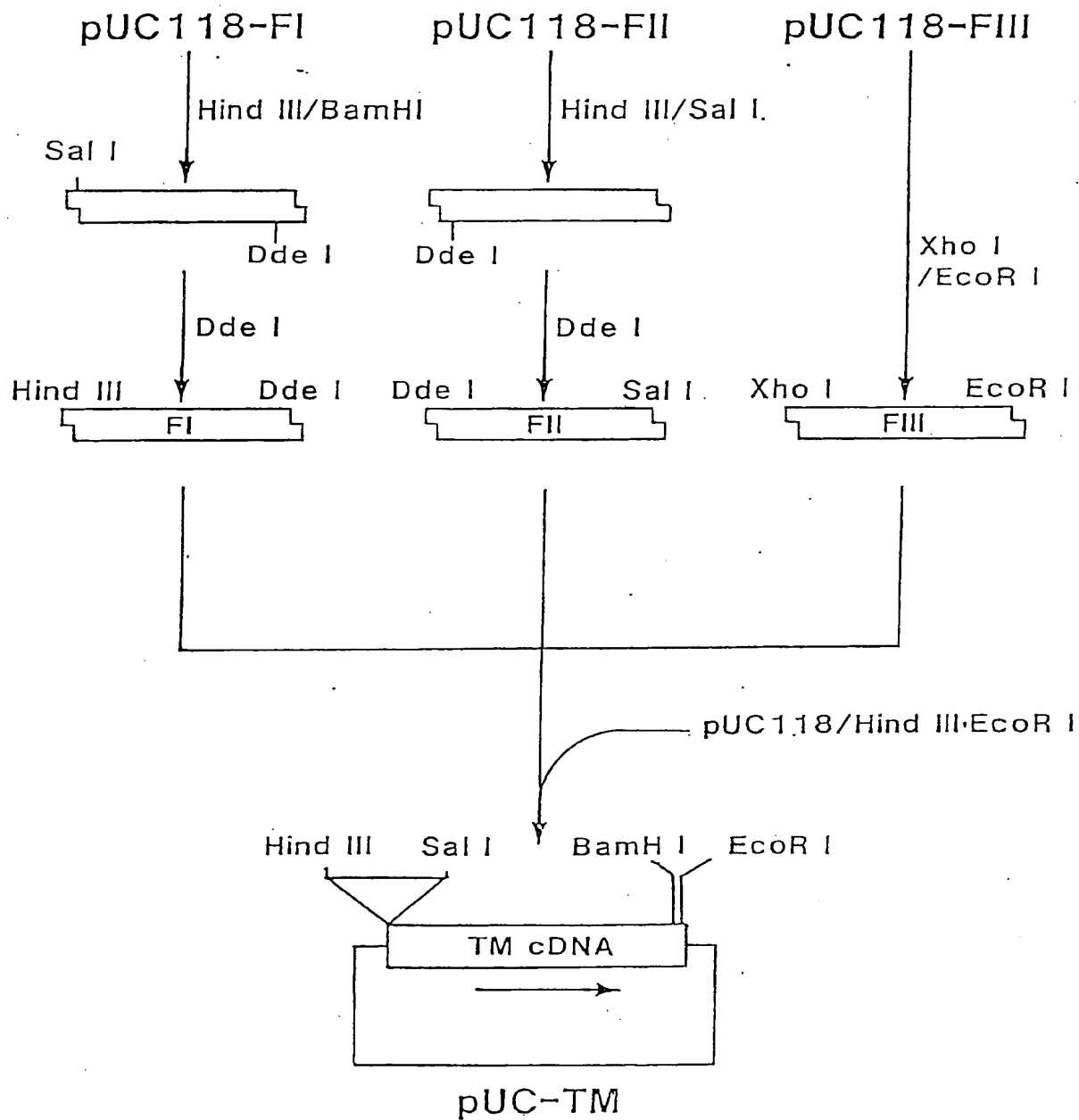
22/32

## 第 7 図

S1	TTGTCGACAT GCTTGGGGTC CTGGTCCTT	29
	Sal I	
S2	ATAAGCTTCC GCTGCTGAGG CCACTGTGC	29
	Hind III	
S3	TTCTGCAGCT CGAGCCCGTG GACCCGTGCT TC	32
	Pst I Xho I	
A1	TTGGATCCCA CAGTGGCCTC AGCAGCGGA	29
	BamH I	
A2	ATGTCGACAC ACTCGCCGTC CACCAGGTC	29
	Sal I	
A3	GCGAATTCGG ATCCTCAGC GGGCAAGGGCC GAGTCGGG	38
	EcoR I BamH I	

23/32

## 第 8 図



24/32

## 第 9 図 ( a )

ATGCTTGGGG	TCCTGGTCCT	TGGCGCGCTG	GCCCTGGCCG	40
GCCTGGGGTT	CCCCGCTCCC	GCAGAGCCGC	AGCCGGGTGG	80
CAGCCAGTGC	GTGAGGCACG	ACTGCTTCGC	GCTCTACCCG	120
GGCCCCGCGA	CCTTCCTCAA	TGCCAGTCAG	ATCTGCGACG	160
GA CTGCGGGG	CCACCTAATG	ACAGTGGGCT	CCTCGGTGGC	200
TGCCGATGTC	ATTTCTTTGC	TACTGAACGG	CGACGGCGGC	240
GTTGGCCGCC	GGCGCCTCTG	GATCGGCCTG	CAGCTGCCAC	280
CCGGCTGCGG	CGACCCCAAG	CGCCTCGGGC	CCCTGCGCGG	320
CTTCCAGTGG	GTTACGGGAG	ACAACAACAC	CAGCTATAGC	360
AGGTGGGGAC	GGCTCGACCT	CAATGGGGCT	CCCCTCTGCG	400
GCCCGTTGTG	CGTCGCTGTC	TCCGCTGCTG	AGGCCACTGT	440
GCCCAGCGAG	CCGATCTGGG	AGGAGCAGCA	GTGCGAAGTG	480
AAGGCCGATG	GCTTCCTCTG	CGAGTTCCAC	TTCCCAGCCA	520
CCTGCAGGCC	ACTGGCTGTG	GAGCCCGGCG	CCGCGGCTGC	560
CGCCGTCTCG	ATCACCTACG	GCACCCCGTT	CGCGGCCCGC	600
GGAGCGGACT	TCCAGGCGCT	GCCGGTGGGC	AGCTCCGCCC	640
CGGTGGCTCC	CCTCGGCTTA	CAGCTAATGT	GCACCGCGCC	680
GCCCGGAGCG	GTCCAGGGGC	ACTGGGCCAG	GGAGGCGCCG	720
GGCGCTTGGG	ACTGCAGCGT	GGAGAACGGC	GGCTGCGAGC	760
ACGCGTGCAA	TGCGATCCCT	GGGGCTCCCC	GCTGCCAGTG	800
CCCAGCCGGC	GCCGCCCTGC	AGGCAGACCG	GCGCTCCTGC	840

25/32

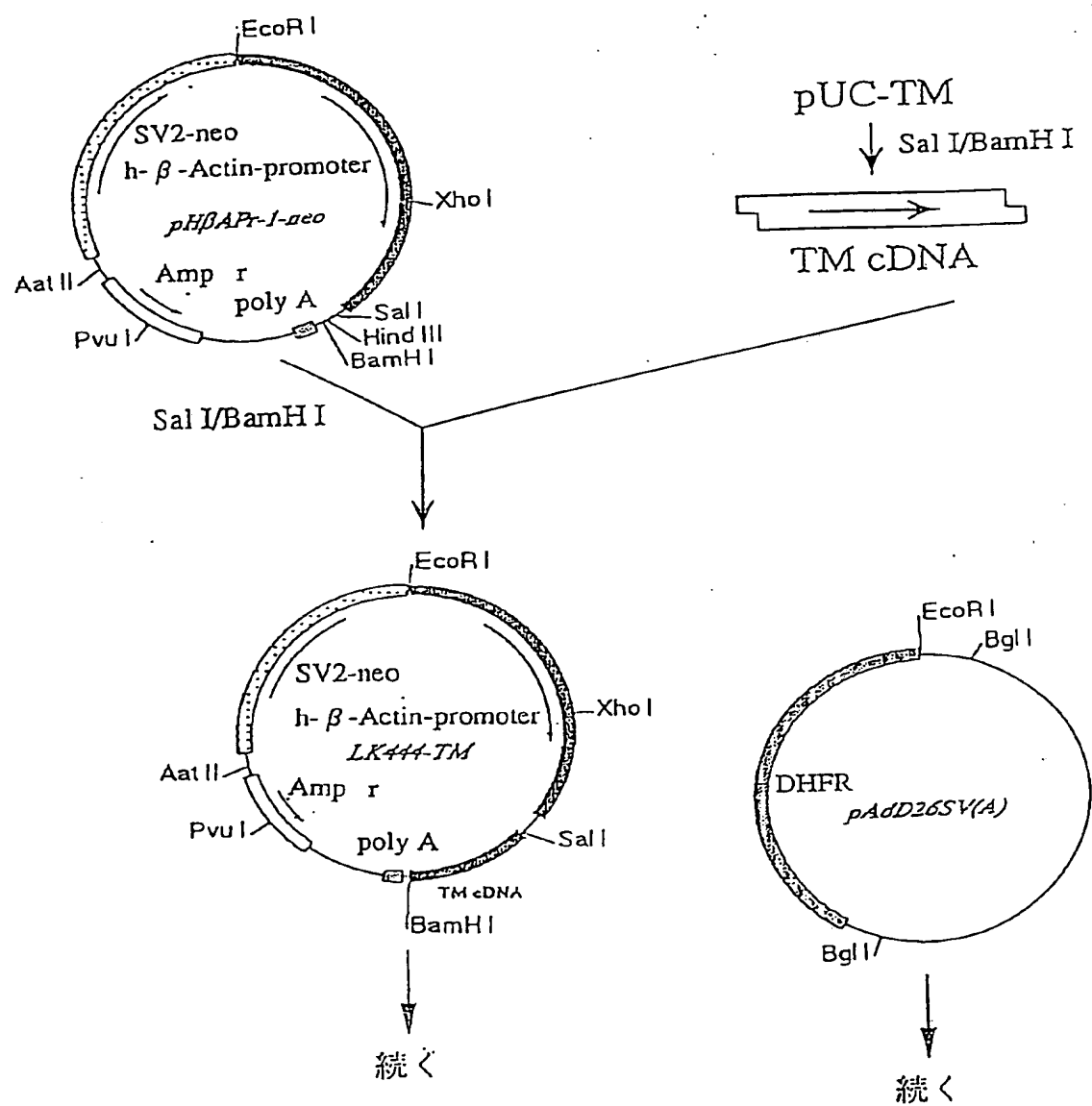
## 第 9 図 ( b )

ACCGCATCCG CGACGCAGTC CTGCAACGAC CTCTGCGAGC	880
ACTTCTGCGT TCCCAACCCC GACCAGCCGG GCTCCTACTC	920
GTGCATGTGC GAGACCGGCT ACCGGCTGGC GGCCGACCAA	960
CACCGGTGCG AGGACGTGGA TGA CTGCATA CTGGAGCCCA	1000
GTCCGTGTCC GCAGCGCTGT GTCAACACAC AGGGTGGCTT	1040
CGAGTGCCAC TGCTACCCTA ACTACGACCT GGTGGACGGC	1080
GAGTGTGTCC AGCCCGTGGA CCCGTGCTTC AGAGCCAACT	1120
GCGAGTACCA GTGCCAGCCC CTGAACCAAA CTAGCTACCT	1160
CTGCGTCTGC GCCGAGGGCT TCGCGCCCAT TCCCCACGAG	1200
CCGCACAGGT GCCAGATGTT TTGCAACCAG ACTGCCTGTC	1240
CAGCCGACTG CGACCCCAAC ACCCAGGCTA GCTGTGAGTG	1280
CCCTGAAGGC TACATCCTGG ACGACGGTTT CATCTGCACG	1320
GACATCGACG AGTGCGAAAA CGGCGGCTTC TGCTCCGGGG	1360
TGTGCCACAA CCTCCCCGGT ACCTTCGAGT GCATCTGCGG	1400
GCCCGACTCG GCCCTTGCCC GCTGA	1425



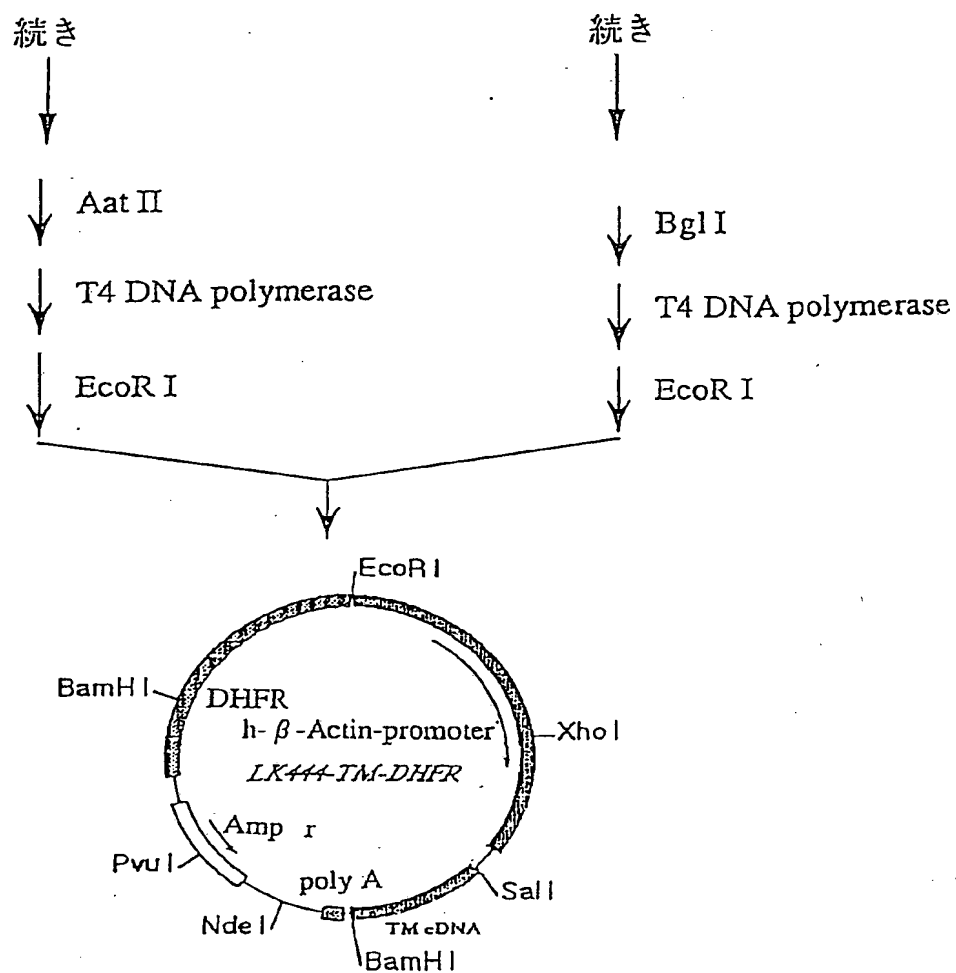
26/32

第 10 図 (a)



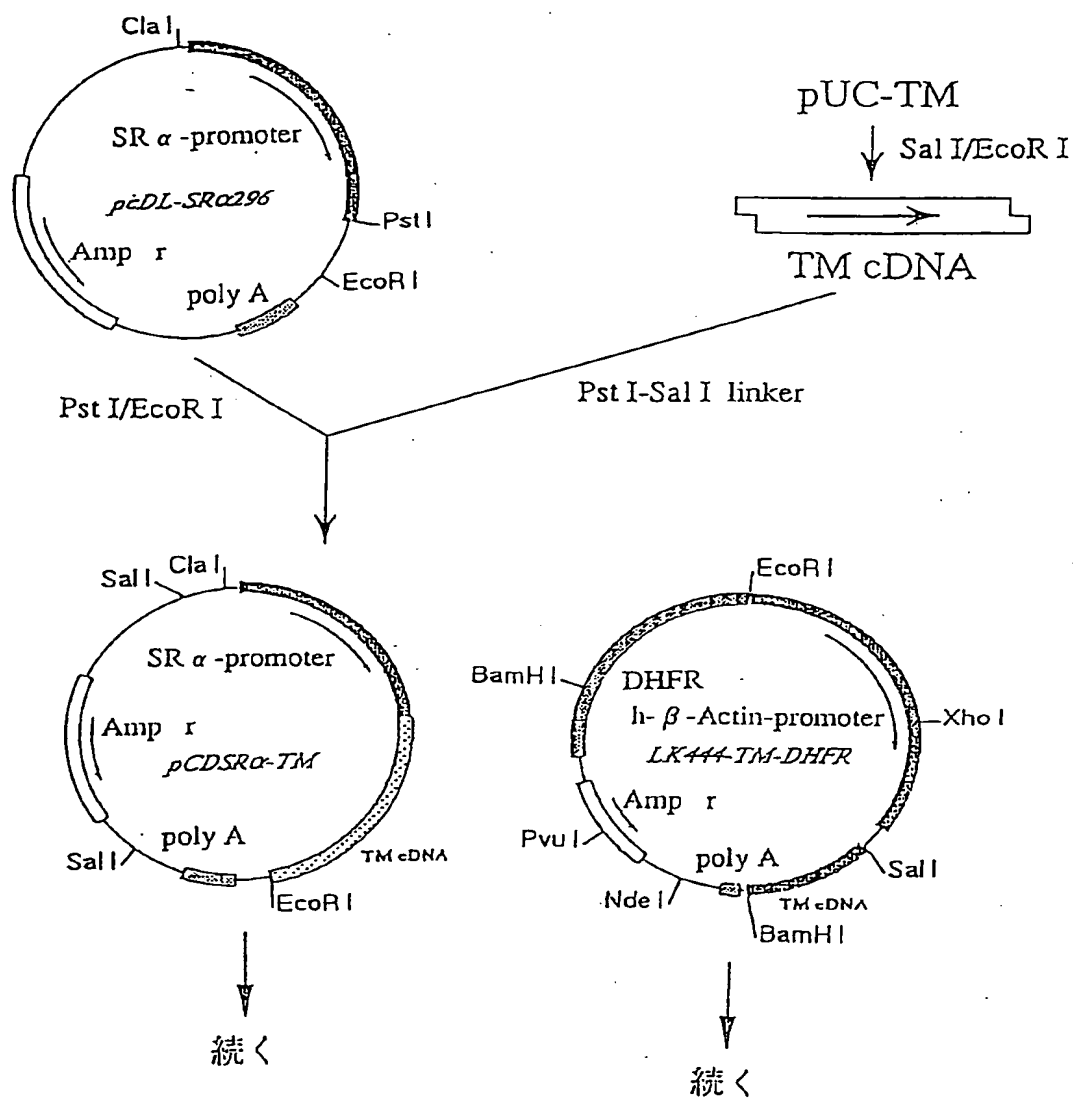
27/32

## 第 1 0 図 (b)



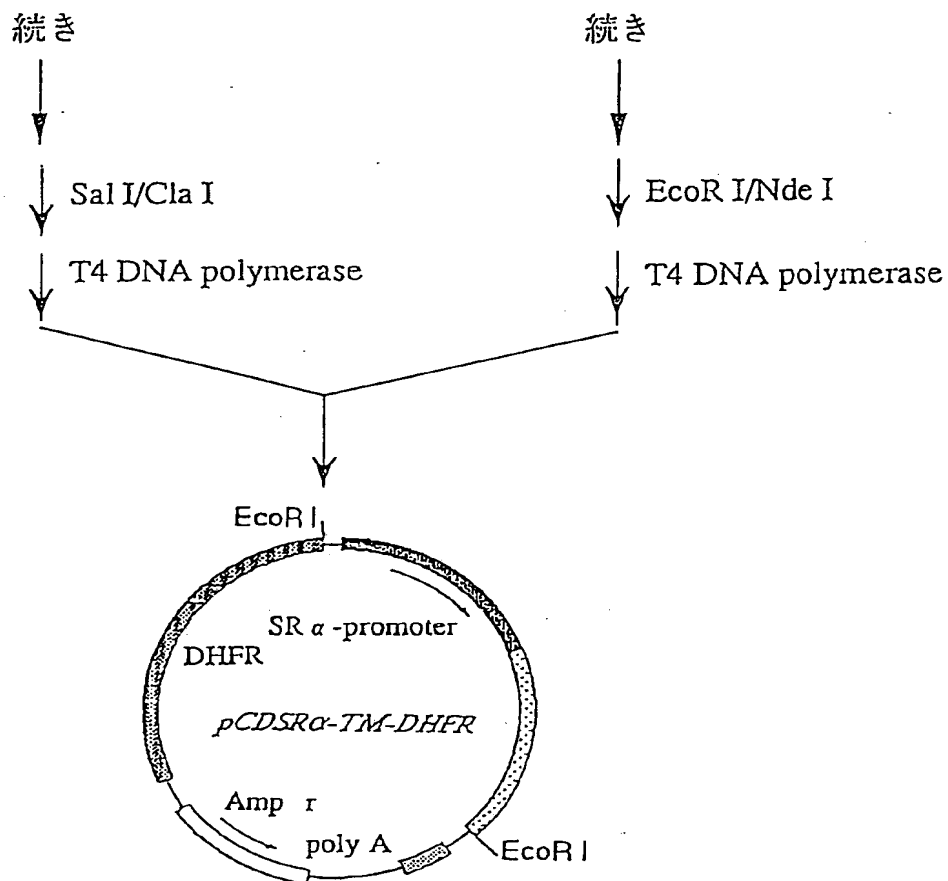
28/32

第 1 1 図 ( a )



29/32

第 1 1 図 (b)



30/32

## 第 1 2 回

## (A) DEL 10 作製用オリゴマー

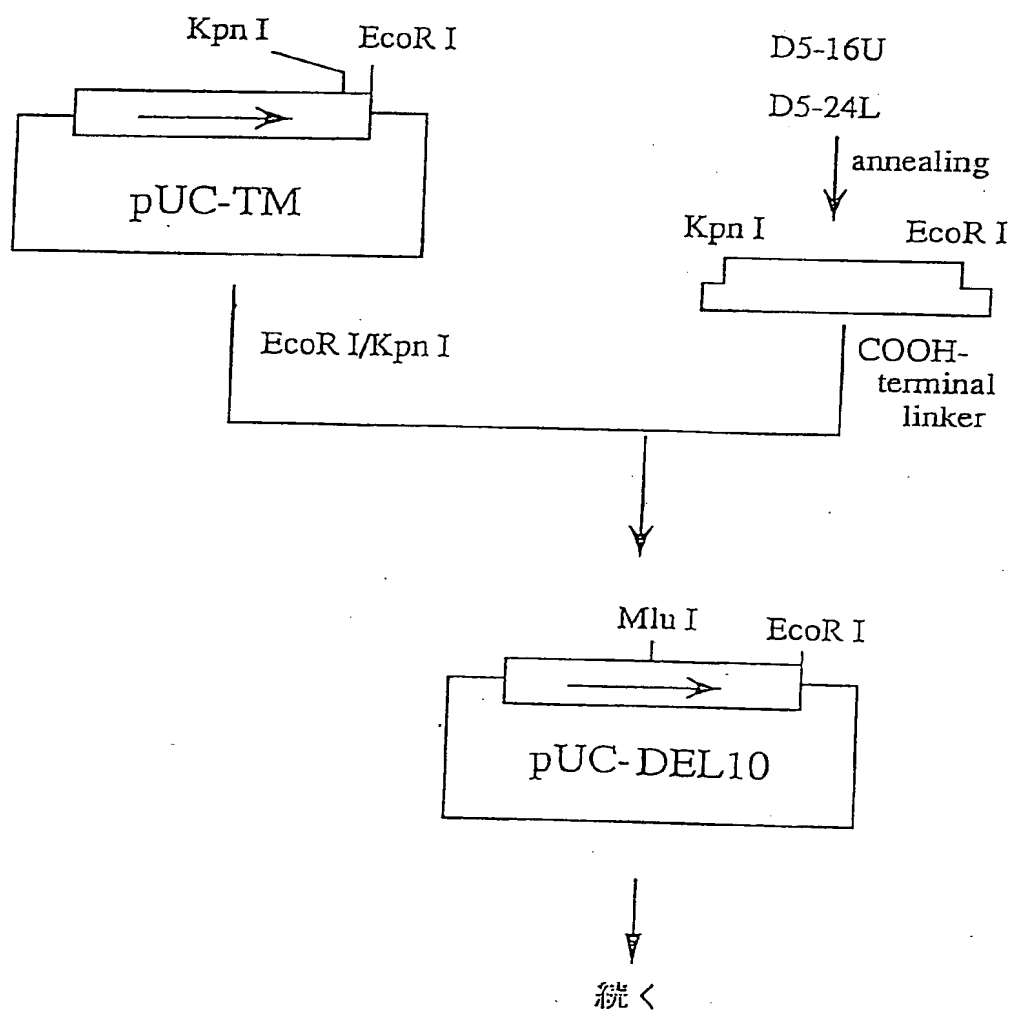
D5-16U	CTTCGAGTGC TGATAG	16
D5-24L	AATTCTATCA GCACTCGAAG GTAC	24

## (B) DEL 49 作製用オリゴマー

D10-14U	CTAGCTGTTG ATAG	14
D10-14L	AATTCTATCA ACAG	14

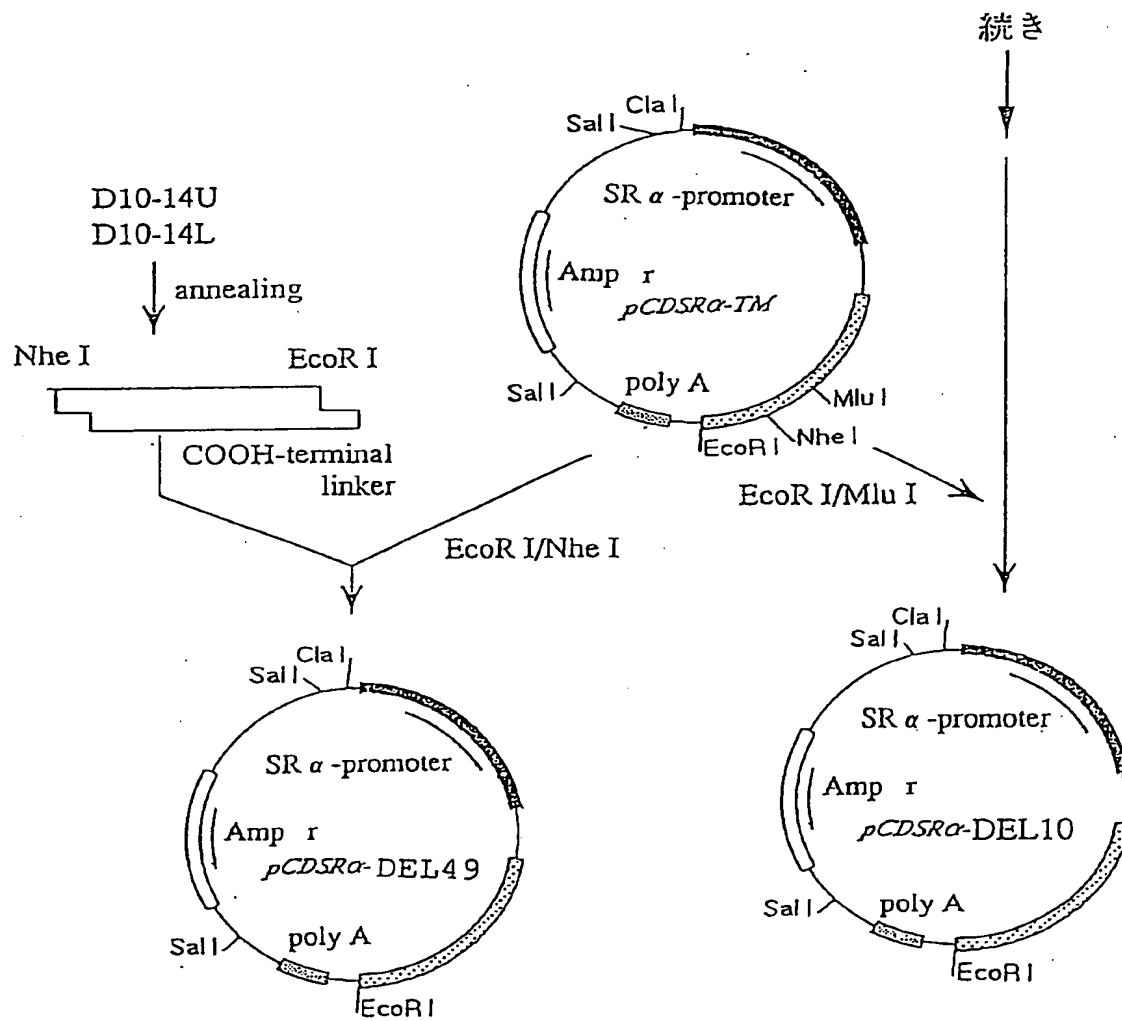
31/32

第 1 3 図 ( a )



32/32

第 1 3 図 ( b )



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00873

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>5</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. C15

C07K13/00, 7/10, A61K37/02, C12N15/12, C12P21/02/(C12P21/02, C12R1:19) (C12P21/02, C12R1:91) C07K99:00

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System

Classification Symbols

IPC

C07K13/00, 15/06, 15/12, 15/14,  
C12N15/12, C12P21/00, 21/02

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>

Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P, X	EP, A2, 376251 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), July 4, 1990 (04. 07. 90), & CA, A, 2006658	1-4, 13-16 /5-12, 17
A	JP, A, 63-301791 (Washington University), December 8, 1988 (08. 12. 88), & EP, A2, 290419 & US, A, 4912207	1-17
A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., Vol.84, No.18, (1987), R.W.Jackman et al. "Human thrombomodulin gene is intron depleted:Nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control" P.6425-6429	1-17
A	Biochemistry, Vol.26, No.14, (1987), D.Wen et al. "Human thrombomodulin complete complementary DNA sequence and chromosome localization of the gene" P.4350-4357	1-17

<sup>\*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international  
filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or  
which is cited to establish the publication date of another  
citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or  
other means

"P" document published prior to the international filing date but  
later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot  
be considered novel or cannot be considered to involve an  
inventive step

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot  
be considered to involve an inventive step when the document  
is combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

September 14, 1991 (14. 09. 91)

Date of Mailing of this International Search Report

October 14, 1991 (14. 10. 91)

International Searching Authority

Japanese Patent Office

Signature of Authorized Officer



## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

A

EMBO Journal, Vol.6, No.7, (1987),  
K.Suzuki et al. "Structure and expression  
of human thrombomodulin A thrombin  
receptor on endothelium acting as a  
cofactor for protein C activation"  
P.1891-1898

1-17

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers ..... because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim numbers ..... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim numbers ..... because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 91/ 00873

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>8</sup> C07K13/00, 7/10, A61K37/02, C12N15/12, C12P21/02// (C12P21/02, C12R1:19) (C12P21/02, C12R1:91) C07K99:00		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C07K13/00, 15/06, 15/12, 15/14, C12N15/12, C12P21/00, 21/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
P, X /A	EP, A2, 376251 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 4. 7月. 1990 (04. 07. 90), & OA, A, 2006658	1-4, 13-16 /5-12, 17
A	JP, A, 63-301791 (ワシントン ユニバーシティー), 8. 12月. 1988 (08. 12. 88), & EP, A2, 290419 & US, A, 4912207	1-17
A	Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 第84巻, 第18号, (1987), R.W. Jackman et al, "Human thrombomodulin gene is intron depleted: Nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control" P. 6425 - 6429	1-17
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
19. 09. 91	14.10.91	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 2 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	内 田 俊 生 ®

第2ページから続く情報

( 目 録 の 続 き )		
A	Biochemistry, 第26巻, 第14号, (1987), D. Wen et al. "Human thrombomodulin complete complementary DNA sequence and chromosome localization of the gene" P. 4350-4357	1-17
A	EMBO Journal, 第6巻, 第7号, (1987), K. Suzuki et al. "Structure and expression of human thrombomodulin A thrombin	1-17

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第 2 ページからの続き)		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
	<p>receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. P. 1891-1898</p>	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)